SYNTHESE VON PUROMYCINANALOGEN ZUR AFFINITÄTSMARKIERUNG RIBOSOMALER PROTEINE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hans-Hagen von Döhren
aus Lüneburg

Göttingen 1974

SYNTHESE VON PUROMYCINANALOGEN ZUR AFFINITÄTSMARKIERUNG RIBOSOMALER PROTEINE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hans-Hagen von Döhren
aus Lüneburg

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Privatdozent Dr. F. Eckstein

Korreferent: Professor Dr. U. Schöllkopf

Tag der mündlichen Prüfung: 1. November 1974

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1972 bis Juli 1974 unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. F. Eckstein in der Abteilung Chemie des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen ausgeführt.

Herrn Dr. Fritz Eckstein danke ich herzlich für Ratschläge, Anregungen und Diskussionen bei der Durchführung dieser Arbeit.
Herrn Professor Dr. F. Cramer danke ich für die wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0023

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG.....1

1.1. Ribosomen und Proteinbiosynthese.....1

1.2. Die Puromycinreaktion.....5

1.3. Die Puromycinbindungsstelle.....7

1.4. Affinitätsmarkierung.....9

2. PROBLEMSTELLUNG: 5'-HALOGENACETYLPUROMYCIN ALS AFFINITÄTSMARKIERER..12

3. SYNTHESE VON 2'-DESOXYADENOSINDERIVATEN.....15

3.1. Darstellung von 3',5'-Dichloracetyl-2'-desoxyadenosin.....16

3.2. Darstellung von 3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin.....19

3.2.1. Schutzgruppen.....19

3.2.2. Kondensation.....20

3.2.3. Abspaltung der Schutzgruppen.....21

3.3. Zur Labilität von Aminoacylnukleosiden.....22

4. SYNTHESE VON PUROMYCINANALOGEN.....24

4.1. Darstellung von 5'-Acetylpuromycin.....25

4.1.1. Schutz der Aminogruppe.....25

4.1.2. Acetylierung.....26

4.1.3. 5'-Acetylpuromycin.....26

4.2. Darstellung von 5'-Chloracetylpuromycin.....27

4.2.1. Chloracetylierung.....27

4.2.2. 5'-Chloracetylpuromycin.....31

Seite

4.3. Darstellung von 5'-Bromacetylpuromycin.....32

4.3.1. Bromacetylierung.....32

4.3.2. Abtrennung der Cbo-Gruppe.....34

4.3.3. N-BOC-puromycin.....34

4.3.4. 5'-Bromacetylpuromycin.....35

5. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT PUROMYCINANALOGEN.....37

5.1. Poly U-abhängige Synthese von Poly-Phenylalanin.....38

5.2. Versuche zur Affinitätsmarkierung.....42

5.2.1. Präparation der Ribosomen.....43

5.2.2. Präparation der Träger-RNS.....44

5.2.3. Peptidyltransferase-Versuche.....47

6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....54

7. EXPERIMENTELLER TEIL.....55

7.1. Allgemeines.....55

7.2. Derivate von 2'-Desoxyadenosin.....57

7.2.1. 3',5'-Dichloracetyl-2'-desoxyadenosin.....57

7.2.2. 3',5'-Diacetyl-2'-desoxyadenosin.....58

7.2.3. 5'-Methoxytrityl-2'-desoxyadenosin.....58

7.2.4. 5'-Methoxytrityl-3'-Cbo-Phe-2'-desoxyadenosin.....60

7.2.5. 3'-Cbo-Phe-2'-desoxyadenosin.....61

7.2.6. 5'-Methoxytrityl-3'-Phe-2'-desoxyadenosin.....61

7.2.7. 3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin.....62

7.3. Derivate von Puromycin.....63

7.3.1. N-Cbo-puromycin.....63

Seite

7.3.2. N,5'-Dicbo-puromycin....64
7.3.3. 2',5'-Diacetyl-N-Cbo-puromycin....65
7.3.4. 5'-Acetyl-N-Cbo-puromycin....65
7.3.5. 5'-Acetyl-puromycin....66
7.3.6. N,2',5'-Triacetyl-puromycin....67
7.3.7. 2',5'-Dichloracetyl-N-Cbo-puromycin....67
7.3.8. 5'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin....68
7.3.9. 2'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin....69
7.3.1o. 5'-Chloracetyl-puromycin....70
7.3.11. N,2'-Diacetyl-5'-Chloracetyl-puromycin....71
7.3.12. Bromessigsäureanhydrid....71
7.3.13. 5'-Bromacetyl-N-Cbo-puromycin....72
7.3.14. N-BOC-puromycin....72
7.3.15. 5'-Bromacetyl-N-BOC-puromycin....73
7.3.16. 5'-Bromacetyl-puromycin....74
7.3.17. 5'-Acetoxyacetyl-N,2'-diacetyl-puromycin....75
7.4. Biologische Tests....75
7.4.1. Präparation von E.coli Ribosomen....75
7.4.2. Poly-Phe-Synthese....76
7.4.3. Beladung der tRNS....77
7.4.4. Darstellung von Acetoxysuccinimid....78
7.4.5. Acetylierung von Phe-tRNS....79
7.4.6. Hydrolyse von N-Acetyl-Phe-tRNS....80
7.4.7. Peptidyltransferaseversuche mit Äthylacetatextraktion...80
7.4.8. Peptidyltransferaseversuche mit TCA-Fällung....81
7.4.9. Peptidyltransferaseversuche ohne DTT....81

8. LITERATURVERZEICHNIS....83

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit benutzt:

Pu	Puromycin
Me	Methyl
A	Adenin-9-
ac	Acetyl
Brac	Bromacetyl
Clac	Chloracetyl
MTr	Mono-p-methoxytrityl
Cbo	Carbobenzoxy
BOC	t-Butyloxycarbonyl
poly U	Polyuridylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
tRNS	Träger-RNS
mRNS	Boten-RNS
rRNS	ribosomale RNS
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthyldiamintetraessigsäure
BSA	Rinderserumalbumin
TCA	Trichloressigsäure
DC	Dünnschichtchromatogramm
A_{260}	Absorption bei 260 nm

1. EINLEITUNG

1.1. Ribosomen und Proteinbiosynthese

Träger der genetischen Information sind die Desoxyribonukleinsäuren (DNS) in den Chromosomen. Während des Transkriptionsvorgangs übersetzt die DNS-abhängige RNS-Polymerase die Nukleotidsequenz der DNS in die Nukleotidsequenz der Boten-Ribonukleinsäure (messenger- bzw. mRNS). Am Ribosom, dem Proteinsyntheseapparat der Zelle, wird diese Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt (Translation). Die Schlüsselstellung bei diesem Vorgang nehmen die Träger-RNS (tRNS) ein, die für bestimmte Aminosäuren spezifisch sind. Sie transportieren die Aminosäuren an das Ribosom heran und erkennen die Nukleotidsequenz der mRNS; je drei Nukleotide sind der Code für eine Aminosäure (Triplett-Code).

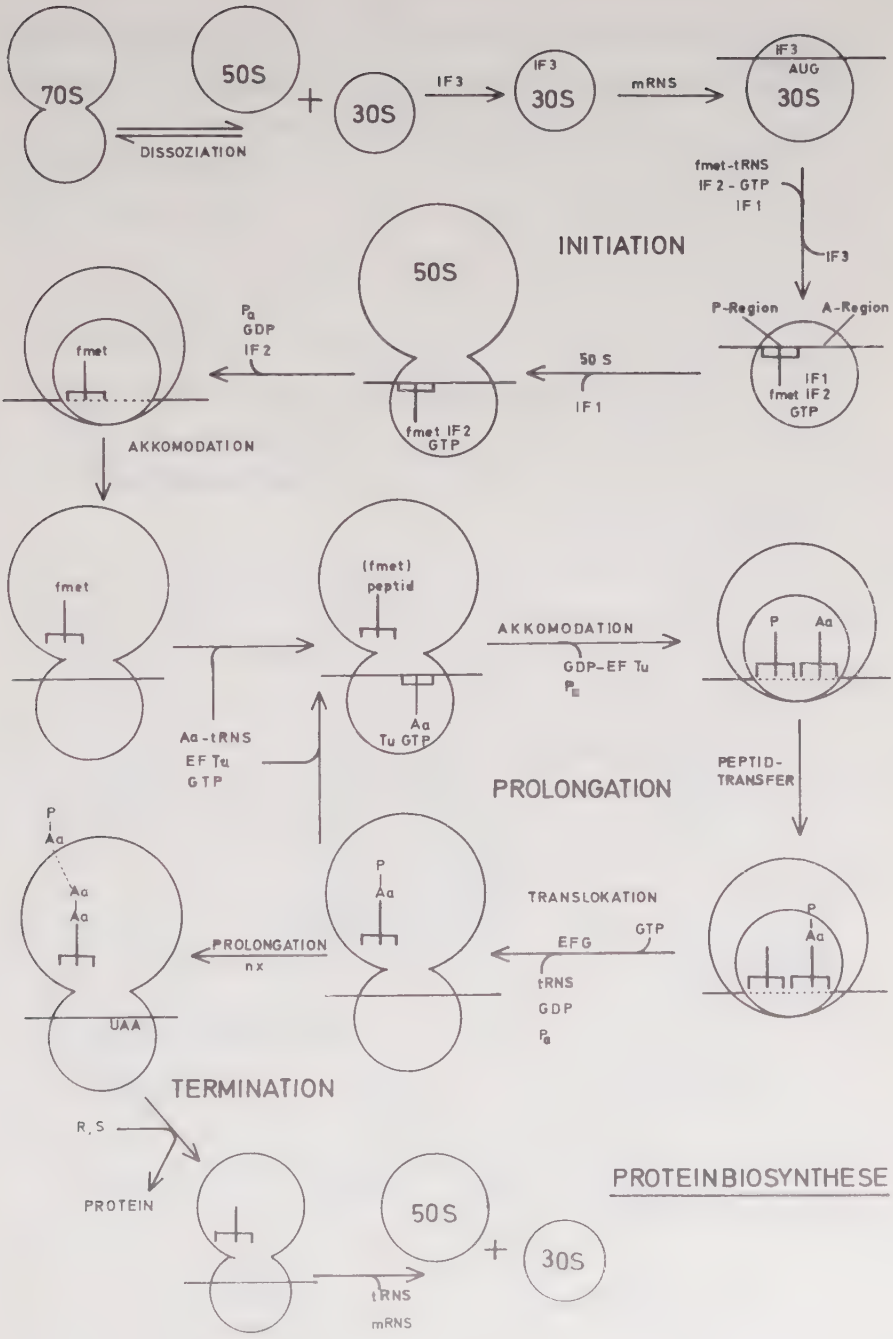
Prokaryotische Ribosomen, z.B. von Escherichia coli-Bakterien, dissoziieren in Untereinheiten, die sich im Sedimentationskoeffizienten unterscheiden (50 S und 30 S) und Molekulargewichte von ungefähr 1.8×10^6 und 0.9×10^6 besitzen. Die größere Untereinheit besteht aus einem Komplex einer 5 S-ribosomalen RNS (rRNS), einer 23 S-rRNS und 34 verschiedener Proteine, die mit L (large subunit) (1) bezeichnet werden und numeriert sind, während sich die kleine Untereinheit aus einer 16 S-rRNS und 21 Proteinen (S = small subunit) zusammensetzt.

Dieser kompliziert strukturierte Körper steuert den Ablauf der Proteinbiosynthese (2-9) über viele differenzierte Reaktionsschritte, die in drei Abschnitte unterteilt werden: Initiation, Prolongation und Termination.

Die Ribosomen liegen in einem Gleichgewicht assoziierter und dissoziierter Untereinheiten vor. Der Initiationsfaktor IF3 befähigt durch seine Anlage-

rung die dissoziierte 30 S-Untereinheit zur Komplexbildung mit der die Geninformation enthaltenden mRNS mit dem Nukleotidtriplett AUG als Startsignal. Die tRNS, die in vorgelagerten Reaktionen durch eine aminosäurespezifische Aminoacyl-tRNS-Synthetase mit N-Formylmethionin beladen worden ist, bildet mit der 30 S-Einheit, IF3 und der mRNS unter Mitwirkung von IF1, IF2 und Guanosintriphosphat (GTP) und gleichzeitiger Abspaltung von IF3 den Initiationskomplex. Die beiden Untereinheiten lagern sich dann unter Austritt von IF1 zusammen und bilden das vollständige 70 S-Ribosom. Im folgenden Schritt wird durch Spaltung von GTP in GDP und anorganisches Phosphat die N-Formylmethionin-tRNS direkt in den Peptidbindungsort (P-Region) an der 50 S-Einheit verlagert (Akkomodation).

Die Verknüpfung von Aminosäuren zum Peptid läuft nun in einem vierteiligen Zyklus ab (Prolongation). Im ersten Schritt wird eine beladene Aminoacyl-tRNS am Aminosäureerkennungsort (A-Region) auf der 30 S-Untereinheit angelagert. Sie muß mit GTP und einem Elongationsfaktor EF Tu versehen sein, und ihr Anticodon, das Erkennungstriplett der tRNS, muß mit dem Codon der mRNS in der A-Region komplementär sein. Im zweiten Schritt wird wieder unter Spaltung von GTP akkomodiert und die aminosäuretragende tRNS dabei in eine günstigere Position der A-Region auf der 50 S-Einheit verrückt. Mit Hilfe eines zweiten Elongationsfaktors EF Ts und GTP wird der für die Akkomodation notwendige EF Tu-GTP-Komplex regeneriert. Der dritte Schritt ist der nukleophile Angriff der freien Aminogruppe in der A-Region auf die energiereiche Esterbindung zwischen Aminosäure und tRNS in der P-Region. Katalysator dieser Reaktion ist die Peptidyltransferase, eines der 34 ribosomalen Proteine der großen Untereinheit. Der letzte Schritt des Prolongationszyklus ist die Translokation unter Mitwirkung des Faktors EF G und Verbrauch von GTP. Hierbei rückt das Ribosom ein Triplett auf der mRNS weiter; die von N-


70S
50S
30S
DISSOZIATION
IF3
IF3
30S
mRNS
IF3
AUG
30S
fmet-tRNS
IF 2 - GTP
IF 1
IF3
INITIATION
P-Region
A-Region
IF1
fmet IF2
GTP
50 S
IF 1
50S
fmet IF2
GTP
Pa
GDP
IF 2
fmet
AKKOMODATION
fmet
(fmet)
peptid
Aa-tRNS
EF Tu
GTP
Aa
Tu GTP
AKKOMODATION
GDP-EF Tu
Pa
P
Aa
PEPTID-
TRANSFER
PROLONGATION
P
Aa
P
Aa
Aa
UAA
PROLONGATION
nx
TRANSLOKATION
EFG
GTP
tRNS
GDP
Pa
P
Aa
TERMINATION
R, S
PROTEIN
50S
30S
tRNS
mRNS
PROTEINBIOSYNTHESE

Formylmethionin- in den folgenden Zyklusdurchläufen vom Peptid - befreite tRNS in der P-Region löst sich vom Ribosom; das Codon mit anhängender Peptidyl-tRNS verschiebt sich von der A-Region in die P-Region, und ein neues Codon gelangt in die A-Region, die wieder eine neue Aminoacyl-tRNS aufnehmen kann.

Nach vielen Prolongationszyklen gelangt in die A-Region ein sog. Unsinncodon der mRNS, zu dem kein tRNS-Anticodon paßt. Während der von den Releasefaktoren R und S katalysierten Termination wird die mRNS vom Ribosom getrennt; die Esterbindung zwischen dem vollständig synthetisierten Protein und der letzten tRNS in der P-Region wird gespalten, und das Ribosom kann in seine Untereinheiten zerfallen.

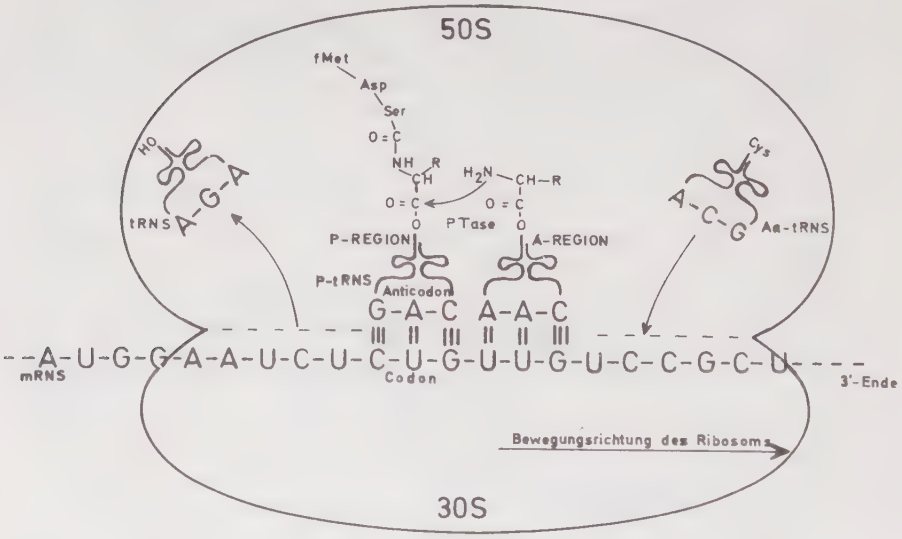
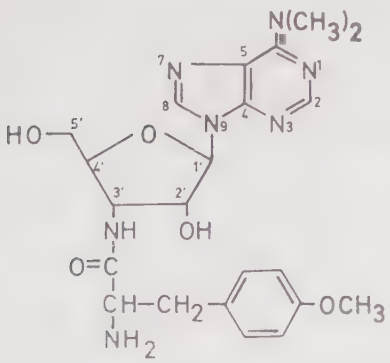


Fig. 1: Schematische Darstellung der Translation.

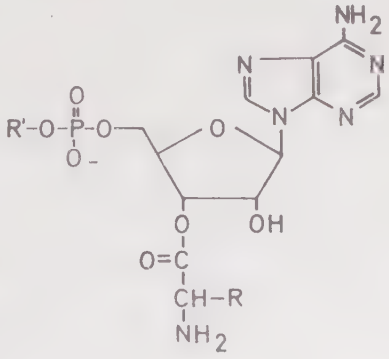
Zahlreiche Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren versucht, dieses komplizierte, zeitliche und räumliche Zusammenwirken verschiedener Faktoren und der ribosomalen Nukleinsäuren und Proteine während der Proteinsynthese aufzuklären (1o-15). Gleichzeitig versuchte man, sich ein Bild von der Struktur der Ribosomen und seiner Bestandteile zu machen. Diese sind zwar alle isoliert und schon weitgehend charakterisiert worden, doch hat man trotz vieler Arbeiten noch relativ geringe Kenntnisse von den Funktionen der einzelnen Strukturelemente und den molekularen Mechanismen.

1.2. Die Puromycinreaktion

Der entscheidende Schritt der Bildung von Amidbindungen zwischen Aminosäuren zum Aufbau von Proteinen wird durch das ribosomale Enzym Peptidyltransferase katalysiert. Eine wichtige Hilfe für die Aufklärung der Mechanismen in der Umgebung dieses Enzyms war die Entdeckung von Yarmolinski und de la Haba 1959 (16), daß das Antibiotikum Puromycin (17,18), dessen Struktur schon durch die Totalsynthese von Baker et al. (19) bewiesen war, dem Ende einer beladenen tRNS in seinem Aufbau gleicht.



PUROMYCIN



Aa - tRNS

Sie zeigten, daß die Bindung der Aminosäure an der 2'- oder 3'-Hydroxygruppe des endständigen Adenosins der tRNS der Bindung des Methyltyrosins an der 3'-Aminogruppe des Puromycins ähnelt. Während der folgenden Untersuchungen stellte man fest, daß Puromycin die wachsende Peptidkette sowohl vom Ribosom als auch von der tRNS löst (2o,21) und selbst an die abgelösten Peptide gebunden ist (22).

Die Puromycinreaktion ist also eine analoge Reaktion zum Kettenwachstum bei der Peptidsynthese: Puromycin wird wie eine Aminoacyl-tRNS am Ribosom gebunden, und seine freie Aminogruppe reagiert an der Esterbindung der Peptidyl-tRNS zum Amid. Der wichtige Unterschied zur Peptidsynthese ist, daß eine weitere Aminosäure an das Methyltyrosin des Puromycins nicht mehr gebunden wird, da die stabile 3'-Amidbindung im Puromycin nicht mehr wie die entsprechende Esterbindung zur tRNS angegriffen werden kann. Damit wird durch den Einbau des Antibiotikums die Kopplung von Aminosäuren beendet, und das unvollständige Protein, das immer ein Molekül Puromycin enthält (23), löst sich vom Ribosom.

Traut und Monro (24) erkannten, daß bei der Reaktion von Puromycin mit dem Peptid nur die große 5O S-Untereinheit des Ribosoms vorliegen muß und daß die Reaktion nur teilweise von löslichen, nichtribosomalen Faktoren und GTP abhängig ist. Meistens wird zur Untersuchung der Puromycinreaktion Polyuridylsäure (poly U) als künstliche mRNS eingesetzt (25) und zur leichteren Kontrolle der Reaktionsprodukte nur eine einzige Amidbindung geknüpft, in dem man analog der N-Formylmethionin-tRNS N-Acetylphenylalanin-tRNS als Donorsubstanz einsetzt. In diesem System werden außer Magnesium hohe Konzentrationen monovalenter Kationen gebraucht. Bei geringer Magnesiumkonzentration (~ 6 mM) werden poly U (26) sowie die Initiationsfaktoren und GTP (27) für die Akkomo-

dation unbedingt benötigt. Bei 10 mM Magnesiumionen stimuliert poly U die Reaktion noch, zwischen 10 und 20 mM werden die Faktoren und GTP nicht mehr benötigt und die Aminoacyl-tRNS oder Puromycin auch ohne poly U am Ribosom gebunden, ohne vorherige Besetzung der P-Region mit einer wachsenden Peptidyl-tRNS (28).

Eine weitere Vereinfachung der Puromycinreaktion ist die Fragmentreaktion. In Gegenwart von Magnesium- und Kaliumionen und 30 % Methanol oder Äthanol werden formylierte oder acetylierte Aminoacyl-tRNS und deren 3'-Oligonukleotidenden sowie Puromycin an die isolierte 50 S-Untereinheit angelagert, so daß die spezifische Reaktion ohne mRNS, GTP, Faktoren und 30 S-Untereinheit ablaufen kann (29-32). Wie diese Komponenten zusammenwirken und die bekannten Reaktionen zwischen den Fragmenten und dem aktiven Peptidyltransferasezentrum am Ribosom ablaufen, ist jedoch noch unbekannt.

1.3. Die Puromycinbindungsstelle

Bretscher und Marcker (33) postulierten zwei Bindungsstellen für die tRNS am Ribosom, die P-Region für die Peptidyl-tRNS und die A-Region sowohl für die Aminoacyl-tRNS als auch für Puromycin. Es gibt zwei Methionyl-tRNS, deren eine (met-$tRNS_F$) formyliert werden kann und so als Initiator der Peptidsynthese wirkt. Sie ist, wenn sie mit dem Starttriplett AUG gleichzeitig am Ribosom gebunden ist, sensitiv für Puromycin, während die andere (met-$tRNS_M$) unter diesen Bedingungen nicht reagiert. Daraus wurde geschlossen, daß met-$tRNS_F$, formyliert oder nicht, in der P-Region des Ribosoms gebunden wird. Met-$tRNS_M$ dagegen wird in der A-Region angelagert und blockiert diese für Puromycin, so daß es nicht zur Reaktion kommen kann.

Coutsogeorgopulos (34) schlug jedoch vor, daß Puromycin nicht über die A-Region in den Aminoacyl-tRNS-Ribosom-mRNS-Komplex gelangt, sondern über eine S-Region, wo die Adenosinenden der beiden tRNS zusammenwirken, um eine Peptidbindung zu bilden. Dieser Schluß basierte auf der Tatsache, daß die Hemmung durch Puromycin nicht durch ansteigende Aminoacyl-tRNS-Konzentrationen gemindert werden konnte.

Dagegen zeigt Tanaka in einem interessanten Versuch, daß Puromycin doch aus der A-Region reagiert (35): Zunächst werden Ribosomen mit ^{14}C-Phe-tRNS in der P-Region und poly U bei 5 mM Magnesium präpariert. Im zweiten Schritt wird die A-Region bei einer Magnesiumkonzentration von 13 mM mit a) ^{12}C-Phe-tRNS, b) N-Acetyl-^{12}C-Phe-tRNS oder c) gar nicht beladen. Nur ^{12}C-Phe-tRNS kann mit seiner freien Aminogruppe an der ^{14}C-Phe-tRNS in der P-Region angreifen. Im dritten Schritt wird Puromycin in Gegenwart und in Abwesenheit von EF G zugesetzt. Im Versuch a) sorgt EF G für die Translokation von ^{14}C-Phe-^{12}C-Phe-tRNS in die P-Region, so daß dieses Dipeptid weiter mit Puromycin reagieren kann. Bei Versuch c) ist die A-Region noch nicht besetzt worden, sie ist also noch für Puromycin frei, das dann ohne EF G mit ^{14}C-Phe-tRNS verbunden wird. Im Versuch b) mit N-Acetyl-^{12}C-Phe-tRNS in der A-Region kann wegen der fehlenden freien Aminogruppe kein Dipeptid gebildet werden; die A-Region bleibt also noch mit dieser tRNS besetzt, und mit Puromycin, das selbst nur aus der A-Region reagieren kann, tritt keine Reaktion ein.

Tab. 1: Der Effekt von Aminoacyl-tRNS in der A-Region auf die Reaktion von ^{14}C-Phe-tRNS mit Puromycin (Tanaka et al. (35)).

^{14}C-Phe-tRNS (P-Region) +	+ Puromycin	
	ohne EF G	mit EF G
a) ^{12}C-Phe-tRNS	107 cpm	468 cpm
b) N-Acetyl-^{12}C-Phe-tRNS	111 cpm	136 cpm
c) -	483 cpm	541 cpm

Auch Gottesman hatte festgestellt (36), daß Puromycin in Abwesenheit von GTP und Faktoren mit Polylysyl-tRNS reagiert, jedoch nicht mit Lysyl-tRNS, die in der A-Region gebunden wird und erst nach der Translokation reagieren könnte.

1.4. Affinitätsmarkierung

In den letzten Jahren wurde von mehreren Arbeitsgruppen versucht, einen genaueren Einblick in das molekulare Geschehen im Ribosom zu erhalten. Auf der einen Seite hat man die Proteine und Ribonukleinsäuren isoliert und versucht, durch Rekonstitution der einzelnen Strukturelemente ihre spezielle Funktion aufzuklären. Auf der anderen Seite will man den spezifischen Bindungsort der tRNS und verschiedener Antibiotika an bestimmten Teilen des Ribosoms genau definieren. Dazu bedient man sich der Affinitätsmarkierung, einer Methode, die schon zur Untersuchung von aktiven Zentren in anderen Enzymen benutzt worden ist (37).

Ein Substrat, das aufgrund seiner komplementären sterischen Eigenschaften und der elektrostatischen und hydrophoben intermolekularen Wechselwirkungen eine Affinität zu einem aktiven Zentrum hat, lagert sich spezifisch und reversibel an dieser Stelle an. Mit Hilfe einer möglichst kleinen, die Affinität nicht beeinträchtigenden, reaktiven Gruppe X wird es dann irreversibel an das aktive Zentrum oder den Bindungsort Y am Enzym gebunden. Durch radioaktive Markierung des Substrates kann der Bindungsort weiter analysiert werden.

Enzym Substrat reversibler Komplex Produkt

Diese Methode sollte auch im Falle des riesigen Enzymkomplexes Ribosom und speziell der Peptidyltransferase oder der Haftstellen für tRNS oder Antibiotika anzuwenden sein.

So wurde zunächst versucht, die P-Region zu markieren, indem Aminoacyl-tRNS an der Aminogruppe blockiert und gleichzeitig mit einer reaktiven Gruppe versehen wurde. Pellegrini et al. setzten in der poly U-abhängigen poly-Phe-Synthese Bromacetyl-Phe-tRNS als Peptidyl-tRNS ein und stellten fest, daß diese kovalent an zwei Proteine der 5O S-Untereinheit gebunden wird (38). Dieses Peptidyl-tRNS-Analoge kann jedoch nur an einer einzigen Peptidknüpfung mit Phe-tRNS oder Puromycin teilnehmen und inhibiert anschließend die weitere Kettenbildung. Die gebundenen Proteine L2 und L27 können durch zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese identifiziert werden (39).

Czernilofsky et al. lagerten p-Nitrophenylcarbamyl-Phe-tRNS mit poly U als mRNS an das Ribosom (4o), markierten hauptsächlich das Protein L27 neben L15, L16, L14, L2 und schlossen daraus, daß diese in unmittelbarer Nachbarschaft zur Peptidyltransferase liegen müßten (41).

Bispink et al. (42) markierten die tRNS-Bindungsstelle mit Äthyl-2-diazomalonyl-Phe-tRNS durch Photolyse und erhielten kovalente Bindungen zur 23 S-rRNS und weniger zu ribosomalen Proteinen.

Bald et al. (43,44) identifizierten die Bindungsstelle des Antibiotikumanalogen Bromamphenicol als L16. Sonenberg et al. (45) markierten dagegen die Proteine L2 und L27 als Bindungsort für Chloramphenicol. Eine photoinduzierte Reaktion von Chloramphenicol mit Ribosomen führte nicht zu einer spezifischen kovalenten Bindung (46).

Pongs et al. (47,48) versuchten die Bindungsstelle des Puromycins mit dessen N-Jodacetylderivat zu markieren. Dieses Derivat wird aber nicht in der für Puromycin charakteristischen A-Region gebunden, da die dafür notwendige freie Aminogruppe acyliert ist. Ob N-Acylderivate des Puromycins überhaupt eine Affinität für Ribosomen, also eventuell für die P-Region, haben, ist unbekannt. Eine Funktion können sie nicht ausüben, und daher sind die mit ihnen erhaltenen Daten in ihrer biologischen Relevanz nicht eindeutig zu interpretieren.

Harris et al. (49) konnten zur gleichen Zeit 5'-O-(N-Bromacetyl-p-aminophenylphosphoryl)-3-N-L-phenylalanylpuromycin-aminonukleosid, das wie Puromycin reagiert, während der Fragmentreaktion mit N-Acetyl-L-^{3}H-leucyl-pentanukleotid zu 97 % an rRNS in Nachbarschaft zur A-Region von Peptidyltransferase binden.

2. PROBLEMSTELLUNG

5'-Halogenacetylpuromycin als Affinitätsmarkierer

Fast alle Untersuchungen am Ribosom mit Hilfe der Affinitätsmarkierung haben sich auf die P-Region der Peptidyltransferase gerichtet. In dieser Arbeit soll ein Puromycinanalogon für die Affinitätsmarkierung an der A-Region dargestellt werden. Um die Affinität des Puromycins zum Ribosom nur minimal zu verändern, soll das Molekül möglichst wenig in seiner Struktur geändert werden.

Die Minimalforderungen an die Struktur von Puromycinderivaten für die Reaktion als Inhibitor der poly U-abhängigen poly-Phe-Synthese stellten 1963 Nathans und Neidle (5o,51) anhand von Untersuchungen mit Puromycinanalogen und -isomeren auf:

1. Aminoacylrest und Nukleosid werden beide benötigt.
2. Sie müssen an der 3'-Position verbunden sein.
3. Die Aminosäure muß in der L-Konfiguration vorliegen.
4. Aromatische Aminosäuren erhöhen die Aktivität wesentlich.
5. Dipeptidseitenketten inaktivieren das Molekül.
6. Das Fehlen der Methylgruppe am Tyrosin oder sein Ersatz durch die größere Butylgruppe vermindert die Aktivität.

1965 substituierten Smith et al. (23) Puromycin in der 5'-Position mit ^{32}P-ß-Cyanoäthylphosphat, ohne die Puromycinaktivität bei der poly A-abhängigen poly-Lys-Synthese zu beeinträchtigen.

Waller et al. (52) stellten 1965 fest, daß 3'-Leucyl- bzw. ein Gemisch von 3'-Phenylalanyl- und Tyrosyl-adenosin die gleichen Reaktionen wie Puromycin bei der poly-Phe-Synthese zeigen, das Leucylderivat jedoch nur sehr schwach.

Zum gleichen Ergebnis kamen 1970 Cerna et al. (53,54) beim Test mit der Fragmentreaktion.

Rychlik et al. (55) substituierten 1967 inaktives 2'(3')-O-Glycyladenosin an der 5'-Hydroxygruppe mit 3'-Phosphorylcytidin bzw. -uridin und mußten feststellen, daß nur das Cytidinderivat (Analogie zum -C-C-A Ende der tRNS!) die puromycinähnliche Aktivität erwirbt.

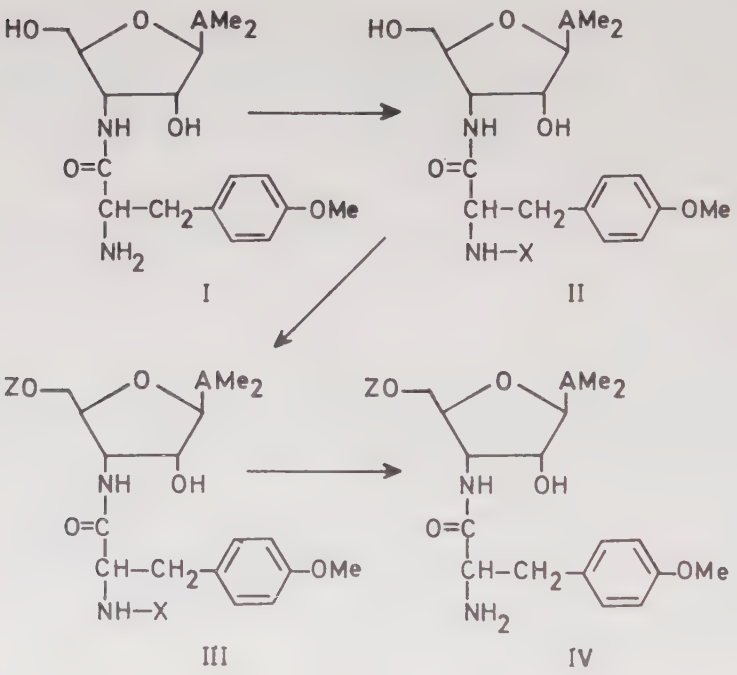
Symons et al (56,57) substituierten 1969 Puromycin in der 5'-Position mit Mononukleotiden, aber nur das 5'-Cytidinderivat zeigte die gewünschte Aktivität (58-60).

Aufgrund der Erfahrungen aus den zitierten Arbeiten sollte nach Substitution durch eine Acetylgruppe in der 5'-Position die Aktivität des Puromycins während der poly U-abhängigen poly-Phe-Synthese wegen der sterischen Veränderung nicht geändert werden. Durch Ersatz der Acetyl- durch eine Halogenacetylgruppe sollte man dann zu einem reaktiven Derivat gelangen, das mit Thiol-, Amino- und Carboxylatgruppen reagieren kann.

Durch Einsatz der Donorsubstanz N-Acetyl-^{14}C-Phe-tRNS für die Reaktion mit dem gebundenen Puromycin soll anschließend der die Puromycinbindungsstelle enthaltende Bestandteil des Ribosoms auf indirektem Wege, jedoch sehr spezifisch radioaktiv markiert werden.

Zur Darstellung von 5'-Acylverbindungen des Puromycins muß selektiv in der 5'-Position acyliert werden. Dazu ist die freie Aminogruppe mit einer Schutzgruppe zu blockieren, die nach der Acylierung auch ohne Angriff auf den 5'-Substituenten abspaltbar ist. Die Substitution in der 2'-Position muß verhin-

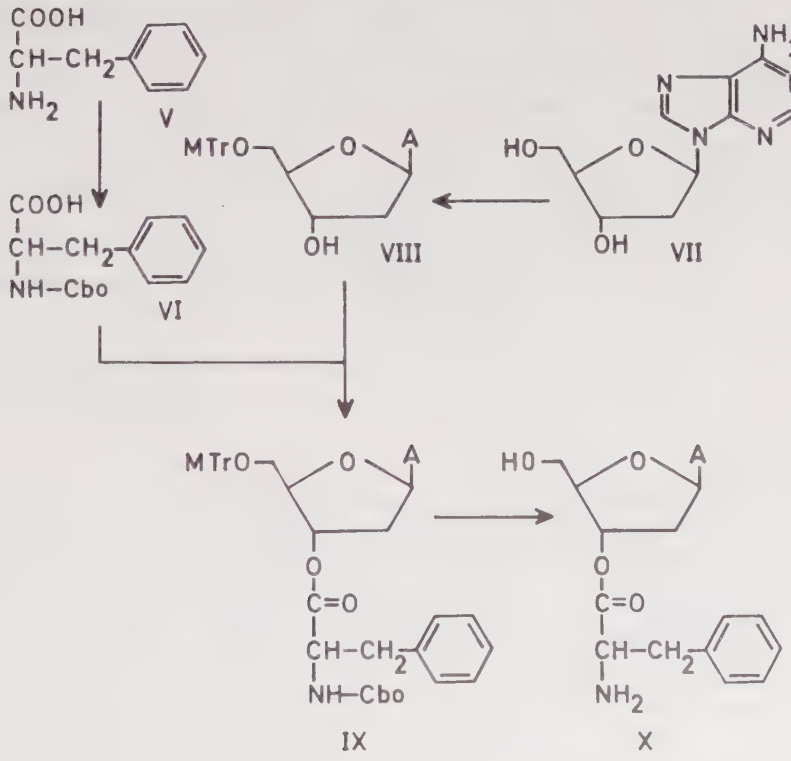
dert werden, und die Labilität der glykosidischen Bindung zwischen Base und Zucker ist zu beachten.



Die notwendigen Syntheseschritte zum 5'-Acetyl- bzw. Chlor- und Bromacetyl-puromycin sollen vorher an einer ähnlich strukturierten, weniger kostspieligen Modellsubstanz erprobt werden. Als Nukleosid scheint 2'-Desoxyadenosin, als Aminoacylkomponente Phenylalanin geeigneter Bestandteil der geforderten Substanz zu sein. Die bekannte Esterlabilität zwischen Adenosin und Aminosäuren (z.B. in Aa-tRNS) sollte durch das Fehlen der vicinalen 2'-Hydroxygruppe im Desoxyadenosin stark gemindert sein. Daher soll zunächst die Synthese von 3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin durchgeführt werden.

3. SYNTHESE VON 2'-DESOXYADENOSINDERIVATEN

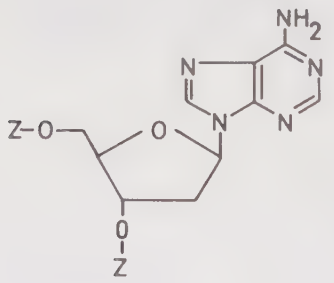
Wegen ihrer Strukturidentität mit dem Ende einer Aminoacyl-tRNS sind verschiedene 3'(2')-O-Aminoacylnukleoside synthetisiert und als analoge Peptidrezeptoren in Proteinbiosynthesesystemen getestet worden (52,53,61-64). Auf die gleiche Weise muß 3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (X) dargestellt werden: Die N-geschützte Aminosäure VI wird mit einem 5'-O-geschützten Nukleosid VIII kondensiert, um eine eindeutige Reaktion zu erhalten. Wegen der geringen Reaktionsfähigkeit aromatischer Amine ist der Schutz der 6-Aminogruppe des Desoxyadenosins nicht notwendig. Nach der Kondensation müssen die Schutzgruppen ohne störende Nebenreaktionen abgetrennt werden.



3.1. Darstellung von Dichloracetyldesoxyadenosin (XIb)

Als Schutz für die 5'-Hydroxygruppe bietet sich die Chloracetylgruppe an, die leicht alkalisch oder unter neutralen Bedingungen selektiv abgespalten werden kann (65,66). Ihre Anwendung soll getestet werden, da sie später auch als reaktive Gruppe für die Affinitätsmarkierung an die 5'-Hydroxygruppe des Puromycins gebunden werden soll.

Beim Einführen der Chloracetylgruppe mit Chloressigsäureanhydrid in Pyridin stellt sich jedoch heraus, daß sich die Reaktivität an der 3'- und der 5'-Hydroxygruppe nicht unterscheidet. Selbst bei vorsichtiger Zugabe von weniger als einem Äquivalent des Anhydrids und unter Kühlung im Eisbad ist keine Selektivität zu erzielen; es entsteht sofort das dichloracetylierte Produkt XIb neben Ausgangssubstanz VII und geringen Mengen der monoacylierten Verbindungen.



XI a: Z= CH_3CO

b: Z= $ClCH_2CO$

Im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator kann man die Produkte sehr gut unterscheiden. Je unpolarer das Molekül durch Acylierung seiner Hydroxygruppen wird, umso größer ist sein R_F-Wert im System Chloroform-Methanol (9:1). Da die 5'-Hydroxygruppe sterisch exponierter ist als die 3'-Hydroxygruppe, wirkt sich ihre Acylierung auf die Polarität des Moleküls viel stärker aus.

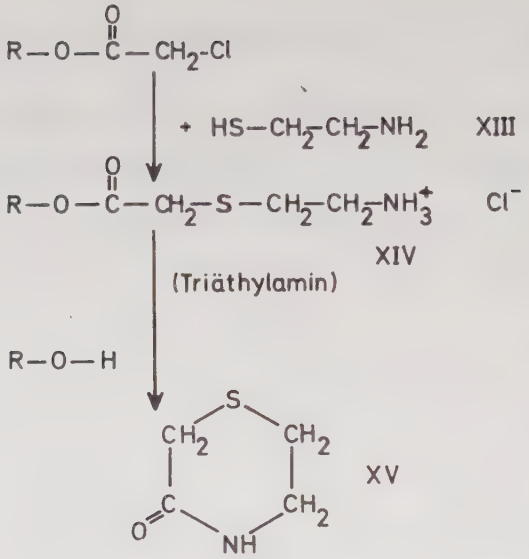
Tab. 2

Substanz	R_F-Wert
2'-Desoxyadenosin	0.15
3'-Chloracetyldesoxyadenosin	0.31
5'-Chloracetyldesoxyadenosin	0.45
3',5'-Dichloracetyldesoxyadenosin	0.55

Durch Zugabe von 2.5 Äquivalenten Chloressigsäureanhydrid und längere Reaktionszeit im Eisbad erhält man quantitativ 5',3'-Dichloracetyl-2'-desoxyadenosin(XIb). Wird die Reaktionstemperatur erhöht, reagiert die Chloracetylgruppe mit dem Lösungsmittel Pyridin zu einem Betain (XII).

XII

Auch eine selektive Abtrennung nur einer Gruppe ist bei Dichloracetyldesoxyadenosin nicht möglich. Die Reaktion mit 2-Mercaptoäthylamin(XIII) und Triäthylamin als Hilfsbase in absolutem Pyridin bei Raumtemperatur führt nach 12 Stunden zu 1.4-Thiazin-3-on (XV) (65,67) und Desoxyadenosin.



Im DC erkennt man anhand von Proben, die nach 15 Minuten und 6 Stunden entnommen werden, daß auch die Abspaltung der Chloracetylgruppen in beiden Positionen gleich schnell verläuft.

Damit scheidet die Anwendung der Chloracetylgruppe als selektiver Schutz der 5'-Hydroxygruppe am Desoxyadenosin aus. Die Acetylierung von Desoxyadenosin, die zu Vergleichszwecken für die Chromatographie durchgeführt wurde, zeigte den gleichen Reaktionsverlauf und denselben R_F-Wert von 0.55 für Diacetyl- (XIa) und Dichloracetyl-desoxyadenosin (XIb).

Als Alternative bietet sich die Reaktion mit Triphenylmethylchlorid als Schutzgruppe.

Im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator kann man die Produkte sehr gut unterscheiden. Je unpolarer das Molekül durch Acylierung seiner Hydroxygruppen wird, umso größer ist sein R_F-Wert im System Chloroform-Methanol (9:1). Da die 5'-Hydroxygruppe sterisch exponierter ist als die 3'-Hydroxygruppe, wirkt sich ihre Acylierung auf die Polarität des Moleküls viel stärker aus.

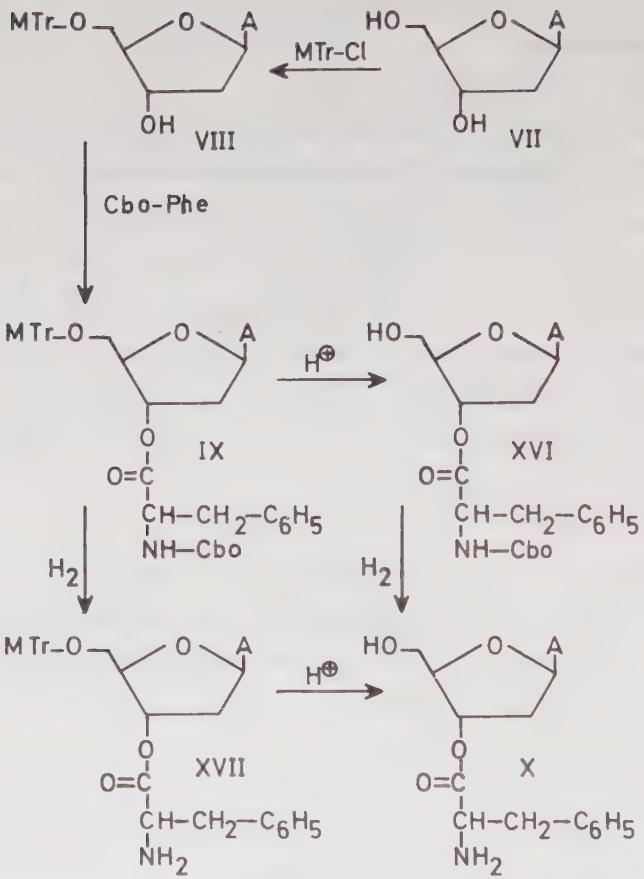
Tab. 2

Substanz	R_F-Wert
2'-Desoxyadenosin	0.15
3'-Chloracetyldesoxyadenosin	0.31
5'-Chloracetyldesoxyadenosin	0.45
3',5'-Dichloracetyldesoxyadenosin	0.55

Durch Zugabe von 2.5 Äquivalenten Chloressigsäureanhydrid und längere Reaktionszeit im Eisbad erhält man quantitativ 5',3'-Dichloracetyl-2'-desoxyadenosin(XIb). Wird die Reaktionstemperatur erhöht, reagiert die Chloracetylgruppe mit dem Lösungsmittel Pyridin zu einem Betain (XII).

XII

Auch eine selektive Abtrennung nur einer Gruppe ist bei Dichloracetyldesoxyadenosin nicht möglich. Die Reaktion mit 2-Mercaptoäthylamin(XIII) und Triäthylamin als Hilfsbase in absolutem Pyridin bei Raumtemperatur führt nach 12 Stunden zu 1.4-Thiazin-3-on (XV) (65,67) und Desoxyadenosin.



3.2.2. Kondensation

5'-Methoxytrityl-2'-desoxyadenosin (VIII) wird mit überschüssigem Carbobenzoxyphenylalanin (VI), das der Aminosäure im Puromycin genügend ähnlich ist, und Dicyclohexylcarbodiimid als geeignetem Kondensationsmittel umgesetzt. Die 2O-stündige Reaktion in absolutem Pyridin kann anhand der Dünnschicht-

chromatographie kontrolliert werden. Nach Beendigung der Reaktion durch Zerstörung überschüssigen Carbodiimids mit Methanol, identifiziert man im DC mit Chloroform-Methanol (9:1) folgende Substanzen: N-Cbo-phenylalaninmethylester (R_F-Wert 0.80), 5'-Methoxytrityl-3'-(N-Cbo-phenylalanyl-)2'-desoxyadenosin (IX) (R_F-Wert 0.68), 3'-(N-Cbo-phenylalanyl-)2'-desoxyadenosin (XVI) (R_F-Wert 0.38) und 5'-Methoxytrityl-2'-desoxyadenosin (VIII) (R_F-Wert 0.32). Die Substanzen mit Methoxytritylgruppen lassen sich durch Besprühen mit 10 %iger Perchlorsäurelösung und kurzes Erwärmen auf 100°C als orangefarbene Flecken nachweisen. Das stabile Produkt 5'-Methoxytrityl-3'-(N-Cbo-phenylalanyl-)2'-desoxyadenosin (IX), das man in 57 %iger Ausbeute erhält, wird auf einer Kieselgelsäule von Nebenprodukten und Dicyclohexylharnstoff gereinigt und mit Elementaranalyse, NMR- und UV-Spektrum nachgewiesen.

3.2.3. Abspaltung der Schutzgruppen

Die anschließende katalytische Hydrierung der Substanz in Essigsäure sollte in einem Schritt Phenylalanyldesoxyadenosin (X) in Freiheit setzen. Im Dünnschichtchromatogramm erkennt man jedoch gleich eine Vielzahl von Produkten aus Nebenreaktionen. Deshalb wird zunächst mit Essigsäure die Tritylgruppe ohne Schwierigkeiten abgetrennt und stabiles N-Cbo-Phenylalanyldesoxyadenosin (XVI) isoliert und charakterisiert, das jedoch nicht kristallisiert werden konnte.

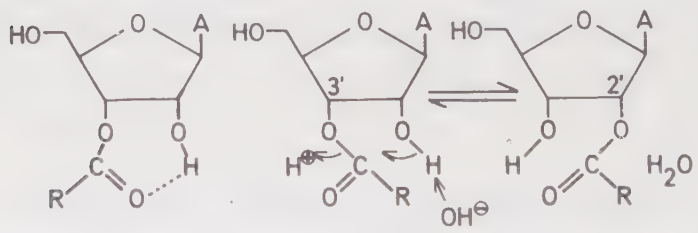
Bei der hydrogenolytischen Abspaltung der Carbobenzoxygruppe wird Palladium auf Aktivkohle als Katalysator und Essigsäure oder Methanol als Lösungsmittel verwendet. In Methanol verläuft die Reaktion langsamer, die Produkte sind dieselben. Nach der Hydrierung von Cbo-Phenylalanyldesoxyadenosin (XVI) wird

im Dünnschichtchromatogramm nur ein Hauptprodukt X identifiziert, das eine positive Ninhydrinreaktion ergibt, also von der Schutzgruppe befreit ist, jedoch in methanolischer Lösung bei Raumtemperatur sofort in Desoxyadenosin, Phenylalanin und dessen Methylester zerfällt.

Die Hydrierung des Tritylproduktes IX in Methanol verläuft analog und ergibt 5'-Methoxytrityl-3'-phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (XVII); daraus bilden sich die Spaltprodukte Methoxytrityldesoxyadenosin (VIII) und Phenylalanin (V).

3.3. Zur Labilität von Aminoacylnukleosiden

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit dem Problem der Esterlabilität an Nukleosiden beschäftigt. So entwickelten Rammler und Khorana 1963 die Synthese von 2'(3')-Aminoacylnukleosiden, die in neutraler Lösung in wenigen Minuten zerfallen (61,71). Die Labilität wurde auf die vicinale Hydroxygruppe zurückgeführt, die gleichzeitig eine schnelle Wanderung der Acylgruppe zwischen der 3'- und 2'-Position bewirkt (63).

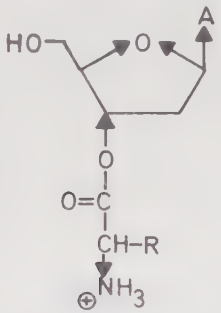


Die 2'-Hydroxygruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff und begünstigt durch den Elektronenzug einen nukleophilen Angriff

auf die Esterbindung.

Durch Beseitigen der vicinalen 2'-Hydroxygruppe sollte eine geringere Labilität zu erwarten sein. Aus meinen Versuchen ist jedoch zu erkennen, daß der Effekt der Hydroxygruppe doch nicht so bedeutend ist.

Auch Zemlicka et al. (72) synthetisierten zwar 3'-Cbo-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin, konnten das Produkt nach Abspaltung der Schutzgruppe jedoch nur UV-spektroskopisch nachweisen. Das Entfernen der Acylgruppe, die zunächst eine Protonierung am Stickstoff durch ihren negativen Induktionseffekt verhindert, verursacht also die Instabilität der Esterbindung durch den äußerst starken Elektronenzug der Aminogruppe. Kürzlich berichteten Robins et al. (73) von der Synthese von 3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin, das ein halbes Äquivalent Formiat enthält und relativ stabil ist.

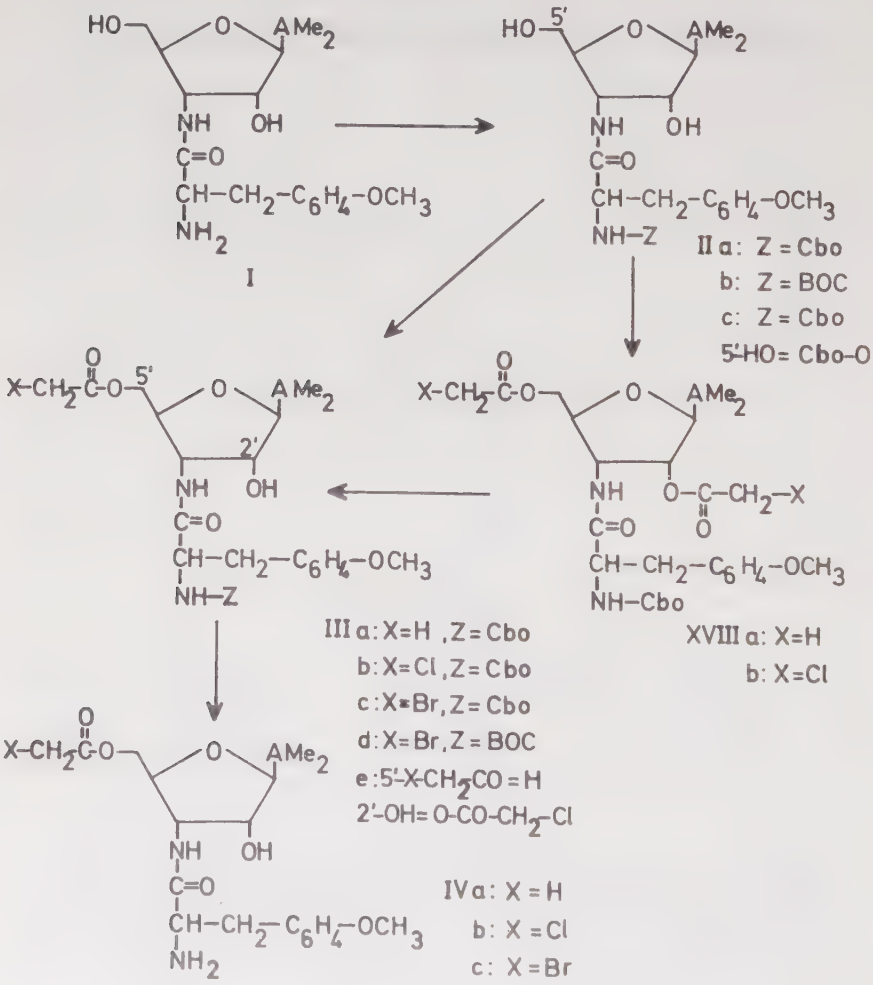


Weitere Gründe für die Instabilität der Esterbindung sind starke -I-Effekte des Ringsauerstoffs (74,75) und der aromatischen Nukleinbase, die noch durch Acylgruppen an der N^6-Aminogruppe verstärkt werden (65).

Aufgrund dieser Erfahrungen ist Phenylalanyldesoxyadenosin (X) als Modellsubstanz für die Reaktionen am Puromycin wegen seiner geringen Stabilität nicht geeignet.

4. SYNTHESE VON PUROMYCINANALOGEN

Für den Test von 5'-acylierten Puromycinderivaten auf ihre biologische Aktivität bei der Inhibition der poly-Phe-Synthese wurde statt der reaktiven Halogenderivate erst das einfache 5'-Acetylpuromycin (IVa) nach folgendem Schema dargestellt:



4.1. Darstellung von 5'-Acetylpuromycin

4.1.1. Schutz der Aminogruppe

Da die reaktivste Gruppe des Moleküls, die freie Aminogruppe, auch im Endprodukt frei sein soll, muß sie vor der Acetylierung der Hydroxygruppe mit einer Schutzgruppe blockiert werden, die sich ohne Spaltung der alkalilabilen Acetylgruppe abtrennen läßt. Hier stehen die t-Butyloxycarbonyl- und die Carbobenzoxy-Gruppe zur Verfügung. Wegen der leichten Abtrennung durch Hydrieren wählte ich die Cbo-Gruppe, die über den Chlorameisensäurebenzylester in Dioxan gut in Puromycin eingeführt werden kann. Da das käufliche Puromycin als Dihydrochlorid vorliegt, wird es in 2 n Ammoniak suspendiert bzw. teilweise gelöst und die freie Base mit viel Chloroform extrahiert. Puromycin ist in Wasser oder organischen Lösungsmitteln nur sehr schwer löslich und muß bei der folgenden Reaktion auch als Suspension eingesetzt werden. Die Reaktion mit wenig Pyridin als Protonenakzeptor in Dioxan verläuft sehr schnell; nach 5 Minuten wird das ausgefallene Pyridinhydrochlorid mit Wasser gelöst, das Reaktionsgemisch eingedampft und wieder in Chloroform und Wasser gelöst. Das Produktgemisch in der Chloroformphase wird auf einer Kieselgelsäule chromatographisch aufgereinigt. Die erste Fraktion ist das Dicarbobenzoxy-Produkt IIc, das auch an der 5'-Hydroxygruppe substituiert worden ist. Als nächste Fraktion wird N-Cbo-puromycin (IIa) als Hauptprodukt in 45 %iger Ausbeute eluiert; der Rest ist nicht umgesetztes Puromycin. Im NMR-Spektrum lassen sich außer dem Zuckerring, dessen Protonen nur undeutlich zu erkennen sind, alle Strukturelemente der Produkte eindeutig nachweisen.

Das 5',N-Dicarbobenzoxypuromycin (IIc) ermöglicht die selektive Veränderung des Puromycinmoleküls in der 2'-Position.

4.1.2. Acetylierung

Die Acetylierung von Carbobenzoxypuromycin (IIa) mit Acetanhydrid und Pyridin als Katalysatorbase ist nach 30 Minuten abgeschlossen. Jedoch ist keine Selektivität zwischen der 5'- und der 2'-Hydroxygruppe zu erzielen. Man erhält ein aus Methanol umkristallisierbares Diacetylderivat XVIIIa des Carbobenzoxypuromycins, was nach den Versuchen einer selektiven Acetylierung am Desoxyadenosin auch zu erwarten war.

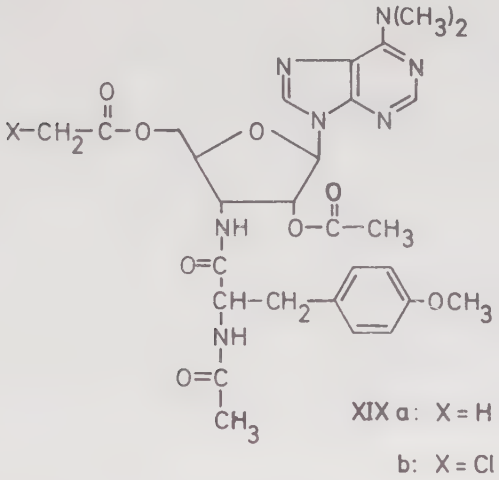
Durch Kontrolle der Reaktionsprodukte im Dünnschichtchromatogramm kann man hier jedoch erkennen, daß zunächst mehr 2'-Acetylprodukt IIIe entsteht, das weiter zum diacylierten Produkt XVIIIa reagiert. Bei der einstündigen Abspaltungsreaktion in 10 Teilen Methanol und 1 Teil 2 n-Ammoniak wird die 2'-Acetylgruppe wieder als erste fast selektiv abgetrennt. Durch Säulenchromatographie des Produktgemisches erhält man neben Carbobenzoxypuromycin (IIa) und dem Ausgangsprodukt Diacetyl-Cbo-puromycin (XVIIIa) in 80 %iger Ausbeute 5'-Acetyl-N-Cbo-puromycin (IIIa), das sich gut umkristallisieren läßt. Der Nachweis, daß die Acetylgruppe am 5'-Sauerstoff sitzt, wird später bei der Besprechung der Chloracetylierung erbracht.

4.1.3. 5'-Acetylpuromycin

Durch katalytische Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle in Essig oder Methanol wird die Carbobenzoxygruppe quantitativ als Toluol und Kohlendioxid abgespalten. 5'-Acetylpuromycin (IVa) wird mit Petroläther aus der Chloroformlösung ausgefällt, kann jedoch nicht kristallisiert werden. Im NMR-Spektrum läßt sich eine Struktur ohne Cbo-Gruppe nachweisen; die Reaktion der

freien Aminogruppe mit dem Nachweisreagenz Ninhydrin verläuft positiv.

Als weiterer Nachweis der Struktur wird die Substanz mit Acetanhydrid und wenigen Tropfen N-Äthyl-diisopropylamin (Hünig-Base) als Protonenakzeptor vollständig acetyliert. Zum Vergleich wird Puromycindihydrochlorid unter gleichen Bedingungen mit Acetanhydrid behandelt, und man erhält aus Äthanol Kristalle von 5',3',N-Triacetylpuromycin (XIXa), die nach Schmelzpunkt und R_F-Wert mit denen identisch sind, die man durch Acetylierung von 5'-Acetyl-puromycin (IVa) erhalten hat.



XIX a: X = H

b: X = Cl

4.2. Darstellung von 5'-Chloracetylpuromycin

4.2.1. Chloracetylierung

Bei der Darstellung von Chloracetylpuromycin (IVb) geht man wieder vom N-Carbobenzoxyderivat IIa aus. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Chloracetylierung ist wegen des Elektronenzugs durch das Chloratom und damit der größeren Elektrophilie höher als bei der normalen Acetylierung. Wegen der

Gefahr von Nebenreaktionen mit dem Lösungsmittel Pyridin wird der Reaktionskolben im Eisbad gekühlt. Wieder entstehen drei Produkte, zwei monoacylierte und ein diacyliertes, die die gleichen R_F-Werte wie die entsprechenden Acetylderivate zeigen. Bei genügendem Überschuß (vierfach) an Chloressigsäureanhydrid erhält man in 95 %iger Ausbeute 5',2'-Dichloracetyl-N-Cbo-puromycin (XVIIIb), das man leicht aus Äthanol umkristallisieren kann.

Der Hinweis der R_F-Werte in der Dünnschichtchromatographie auf die verminderte Polarität der Moleküle durch die Acylierung der verschiedenen Hydroxygruppen und damit auf die Position der Chloracetylgruppen im Molekül gilt wie bei den entsprechenden Gruppen im Dichloracetyldesoxyadenosin (XIb). Das Ausgangsprodukt IIa ist mit zwei Hydroxygruppen relativ polar und läuft langsam (R_F-Wert 0.66). Beim 5'-Derivat IIIb ist die exponiertere Stelle im Molekül verändert, so daß sich auch ein sterischer Effekt auf die unterschiedlichen R_F-Werte vom 5'- und 2'-Derivat (R_F-Wert 0.78 bzw. 0.72) bemerkbar macht. Dichloracetyl-N-Cbo-puromycin (XVIIIb) läuft mit den wenigsten polaren Gruppen am schnellsten (R_F-Wert 0.83). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität bzw. hydrophoben Eigenschaften lassen sich diese Verbindungen leicht auf Kieselgelsäulen mit Chloroform-Methanol-Gemischen auftrennen.

Als Beweis für den Ort der jeweiligen Substitution kann man die chemische Verschiebung der benachbarten Riboseprotonen im NMR-Spektrum heranziehen.

Fig. 2: Dünnschichtchromatogramm von Puromycinderivaten auf Kieselgel mit Fluoreszenzindikator.

Laufmittel: Chloroform-Methanol (9:1)

(Die R_F-Werte von Acetyl-, Chloracetyl- und Bromacetylverbindungen unterscheiden sich nur unwesentlich).

Tab. 3: Chemische Verschiebung der Protonen im Ribosering von Cbo-Puromycin und seinen Chloracetylderivaten.

δ(in ppm)	Cbo-Pu IIa	5'-Clac-Cbo-Pu IIIb	2'-Clac-Cbo-Pu IIIe	5',2'-$Clac_2$-Cbo-Pu XVIIIb
1'-CH	5.7	5.9	5.9	6.1
2'-CH	4.3	4.2 - 4.7	5.4	5.7
3'-CH	4.3	4.2 - 4.7	4.0 - 4.7	4.2
4'-CH	3.8	4.2 - 4.7	4.0 - 4.5	4.2
5'-CH_2	3.8	4.3	3.8	4.2

Klar zu erkennen ist, daß beim 2'- und 2',5'-Produkt die 2'-Protonen wegen des starken Elektronenzugs der Acylgruppen weniger vom Magnetfeld abgeschirmt werden und die Signale deshalb im niedrigeren Feld liegen (höhere δ-Werte). Den gleichen Effekt beobachtet man bei den 5'-Protonen des 5'- und 2',5'-Produktes.

Da die Ausbeute an 5'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin (IIIb) bei der direkten Chloracetylierung nicht größer als 10 % ist, wird der Weg über die ammoniakalische Abspaltung der 2'-Chloracetylgruppe gewählt, der eine Ausbeute von 70 % bringt. Wegen der erhöhten Reaktivität der Chloracetylgruppe wird 2',5'-Dichloracetyl-N-Cbo-puromycin (XVIIIb) in 100 Teilen Methanol gelöst, mit zwei Teilen 2 n-Ammoniak versetzt und das Reaktionsgemisch sofort im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Die erste Fraktion, die man bei der chromatographischen Trennung erhält und aus Äthanol umkristallisiert, ist 5'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin (IIIb), das durch NMR-Spektrum und Elementaranalyse nachgewiesen wird.

4.2.2. 5'-Chloracetylpuromycin

Die Abtrennung der Carbobenzoxyschutzgruppe erfolgt wieder durch katalytische Hydrierung in Eisessig. Nach Beendigung der zweistündigen Reaktion wird mehrmals mit Wasser abgedampft, um die Essigsäure zu entfernen. Die Gesamtausbeute von 5'-Chloracetylpuromycin (IVb) aus Puromycin über vier Reaktionsschritte beträgt 28 %.

Das Umkristallisieren des farblosen Produktes IVb bringt Schwierigkeiten; so erhielt ich aus Iospropanol zu wenige Kristalle für die Charakterisierung der Substanz. Die freie Aminogruppe läßt sich durch die Ninhydrinreaktion nachweisen. Im NMR-Spektrum kann man die Purinbase und den Methyltyrosinrest erkennen, das Signal der Chloracetylprotonen ist wegen der gehäuften Zuckerprotonen zwischen δ = 4.1 und 4.6 ppm und der schlechten Auflösung nicht zu identifizieren. Der Analysenwert des Chlorgehaltes ist sehr ungenau und könnte, wenn während der Hydrierung auch die Chloracetylgruppe reduziert würde, auch vom Hydrochlorid der Substanz stammen.

Bei meinem Versuch der Hydrierung von Dichloracetyldesoxyadenosin (XIb) läßt sich jedoch kein Chloratom substituieren. Im NMR-Spektrum sind vor und nach der Hydrierung die Chloracetylprotonen bei δ = 4.3 ppm gut zu erkennen.

Es ist bekannt (76,77), daß in α,α-Dichlor-ε-caprolactam durch katalytische Hydrierung unter Bedingungen, wie sie bei meiner Reaktion vorliegen, nur ein einziges Chloratom gegen Wasserstoff ausgetauscht wird. Daraus kann man schließen, daß auch eine Chloracetylgruppe inert gegen Hydrierungen ist.

Die Unterscheidung von Chloracetyl- (IVb) und Acetylpuromycin (IVa) im Dünnschichtchromatogramm ist unmöglich, da sich durch Ersetzen von Wasserstoff durch Chlor weder die Größe noch die Polarität des Moleküls wesentlich ändert und die R_F-Werte daher gleich sind.

Ein Massenspektrum zum Beweis von Chloracetylpuromycin (IVb) ist wegen der extrem geringen Flüchtigkeit nicht zu erhalten. Daher wird die Verbindung mit Acetanhydrid vollständig acetyliert und ein Massenspektrum vom leicht zu kristallisierenden 5'-Chloracetyl-3',N-diacetylpuromycin (XIXb) aufgenommen, in dem Molekülpeaks bei 631 und 633 im Verhältnis der Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl (5:2) auftreten. Weitere sehr charakteristische Peaks findet man bei 121 für den Methoxybenzylrest (78) und wegen der leichten Abspaltung von Chlor bei 596. Analysen der Produkte liegen vor, und mit den durchgeführten Untersuchungen ist auch die Struktur des 5'-Chloracetylpuromycins (IVb) bewiesen.

4.3. Darstellung von 5'-Bromacetylpuromycin

Die Bromacetylierung verläuft im Prinzip wie die Chloracetylierung, jedoch verursacht die unterschiedliche Elektronegativität der Halogenatome bemerkenswerte Unterschiede in der Reaktivität der Gruppen.

4.3.1. Bromacetylierung

Das benötigte Bromessigsäureanhydrid läßt sich einfach und schnell in Essigsäureäthylester aus Bromessigsäure und 0.55 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodi-

imid darstellen. Nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird der ausgefallene Harnstoff abfiltriert. Das Produkt wird isoliert, indem man auf ein kleines Volumen einengt und die Substanz auskristallisieren läßt oder die Esterlösung zur Ausfällung der Substanz in das zehnfache Volumen Petroläther tropft und anschließend unter Feuchtigkeitsausschluß umkristallisiert. An feuchter Luft zerfließen die farblosen Kristalle zu einem sich bräunlich färbenden Brei.

Bromacetylierungsversuche mit Desoxyadenosin analog der Darstellung des Dichloracetylderivates XIb in Pyridin schlugen fehl. Selbst unter Eiskühlung reagiert das Lösungsmittel sofort zum Pyridinbetain. Auch aus der Reaktion in absolutem DMF lassen sich bei Desoxyadenosin keine chloroformlöslichen Bromacetylverbindungen isolieren; in Nebenreaktionen entsteht eine Vielzahl von nicht weiter untersuchten Produkten.

Die Substituierbarkeit der Halogenatome an einer Acetylgruppe steigt von Chlor über Brom zum Jod. Mit steigender Reaktivität nimmt jedoch die Selektivität der Halogenacetylgruppen ab; das kann sich später sehr negativ auf eine spezifische Affinitätsmarkierung auswirken. Auf der anderen Seite fällt die Reaktivität der Carbonylgruppe von Chloracetyl zum Bromacetyl wegen des geringeren -I-Effektes von Brom. Die damit steigende Selektivität hat zur Folge, daß N-geschütztes Puromycin nicht mehr in der 2'-Position angegriffen wird.

Aus der Reaktion von N-Cbo-Puromycin mit Bromacetanhydrid in wasserfreiem DMF erhält man daher auf direktem Wege 5'-Bromacetyl-N-Cbo-puromycin (IIIc), das sich in Chloroform löst, leicht kristallisiert und charakteristisiert werden kann.

4.3.2. Abtrennung der Carbobenzoxygruppe

Um Bromacetylpuromycin (IVc) zu erhalten, wird das Cbo-Produkt IIIc wieder katalytisch hydriert. Unter den beschriebenen Bedingungen erhält man ein Produkt, das sich wie das Chloranaloge IVb schlecht löst und nicht kristallisiert. Zur weiteren Charakterisierung der Substanz wird das Rohprodukt gleich in Acetanhydrid vollständig acetyliert. Im Dünnschichtchromatogramm läuft nur ein Produkt, dessen R_F-Wert dem von Triacetylpuromycin gleicht. Im NMR-Spektrum sind drei getrennte Signale für Acetylgruppen zu identifizieren. In der Elementaranalyse fehlt Brom, während die anderen Werte auf Triacetylpuromycin (XIXa) zutreffen.

Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß bei der Hydrierung von 5'-Bromacetyl-N-Cbo-puromycin (IIIc) auch die Bromacetylgruppe reduziert worden ist - im Gegensatz zur weniger reaktiven Chloracetylgruppe. Deshalb ist ein Schutz der freien Aminogruppe am Puromycin durch die Carbobenzoxygruppe während der Bromacetylierung nicht möglich. Es muß eine Aminoschutzgruppe gefunden werden, deren Abspaltung weder durch Hydrieren noch unter alkalischen oder stark sauren Bedingungen möglich ist.

4.3.3. N-t-Butyloxycarbonylpuromycin

Als säurelabiler Schutz für die Aminogruppe des Puromycins kann die BOC-Gruppe eingesetzt werden, da die Gefahr einer Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen Purin und Ribose, wie sie bei der Behandlung von Desoxyadenosinderivaten mit Trifluoressigsäure auftritt, durch die 2'-Hydroxygruppe (79,80) und die N^6-Methyl-Gruppen stark gemindert wird.

Puromycindihydrochlorid wird in Dimethylformamid gelöst und durch zwei Äquivalente Triäthylamin als feiner Niederschlag gefällt. Durch Zugabe von zwei Äquivalenten t-Butyloxycarbonylazid erhält man nach zwei Tagen bei Raumtemperatur in guter Ausbeute N-BOC-puromycin (IIb), das auf präparativen Kieselgelplatten gereinigt und anschließend aus Wasser-Äthanol umkristallisiert wird. Die Laufgeschwindigkeit im Dünnschichtchromatogramm gleicht der der Cbo-Verbindung IIa. Im NMR-Spektrum läßt sich das Singulett der neun äquivalenten t-Butylprotonen bei δ = 1.44 ppm leicht identifizieren.

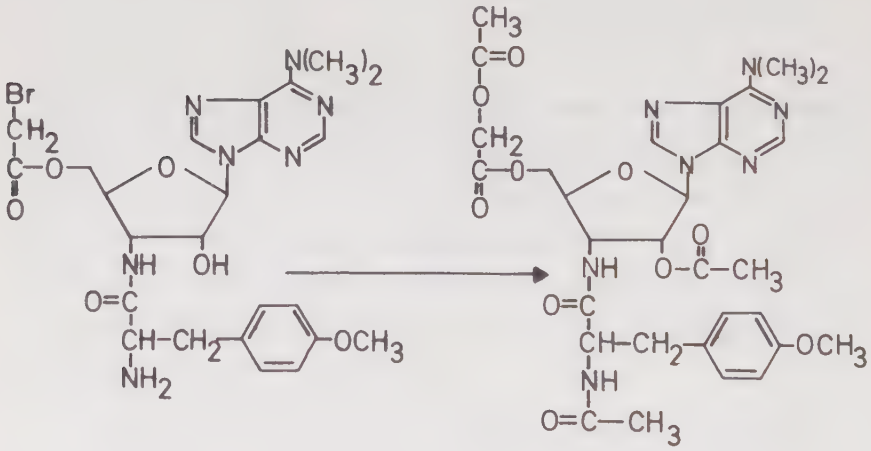
4.3.4. 5'-Bromacetylpuromycin

Wegen der geringeren Reaktionsfähigkeit der Bromacetylgruppe ergibt die Bromacetylierung auch beim BOC-puromycin IIb direkt 5'-Bromacetyl-BOC-puromycin (IIId) in nur 30 %iger Ausbeute. Das Produkt wird auf Kieselgelplatten im System Chloroform-Äthanol (40:1) aufgereinigt. Die gewünschte Substanz IIId kristallisiert aus Benzol-Methanol zu farblosen Nadeln und kann gut charakterisiert werden.

Die BOC-Schutzgruppe wird abgetrennt, indem man die Substanz IIId mit 100 %iger Trifluoressigsäure versetzt, im Vakuum sofort eindampft und danach noch mehrmals mit Acetonitril abdampft. Ein Dünnschichtchromatogramm zeigt nur eine Substanz, die wegen ihrer freien Aminogruppe mit Ninhydrin reagiert. Nach der Reinigung auf einer Kieselgelplatte findet man in der Elementaranalyse die dem Bromacetylpruomycin (IVc) entsprechende Menge Brom.

Zur weiteren Charakterisierung wird 5'-Bromacetylpuromycin (IVc) acetyliert. Während bei der Reaktion des analogen Chlorderivates IVb N,2'-Diacetyl-5'-

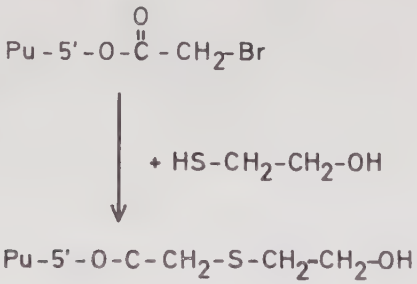
chloracetyl-puromycin (XIXb) entsteht, reagiert diese Substanz auch an der Bromacetylgruppe. In Essigsäureanhydrid und mit katalytischen Mengen N-Äthyldiisopropylamin erhält man durch nukleophile Substitution des Bromatoms durch das entstehende Acetatanion 5'-Acetoxyacetyl-2',N-diacetylpuromycin (XX), das chromatographisch gereinigt werden kann. Aus Äthanol erhielt ich nur wenige Kristalle, die jedoch für ein Massenspektrum ausreichten. Der Molekülpeak liegt bei 655; die Signale der Bruchstücke stimmen mit den Werten überein, die Eggers et al. (78) bei Puromycin und dessen Acetylderivaten beobachtet haben.



IV c XX

Im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Chloroform-Methanol (9:1) als Laufmittel verhält sich 5'-Bromacetylpuromycin (IVc) wie die analogen Chloracetyl- und Acetylverbindungen (R_F-Wert 0.31). Eine Hydrolyse der Bromacetylgruppe oder die Substitution des reaktiven Bromatoms durch eine Hydroxygruppe während der Aufarbeitung der Substanz ist auszuschließen, da die ent-

sprechenden Reaktionsprodukte wegen der geringeren Hydrophobie durch die 5'-Hydroxy- oder 5'-Hydroxyacetylgruppe im DC wesentlich langsamer laufen würden. Eine Testreaktion von 5'-Bromacetylpuromycin (IVc) mit 2-Mercaptoäthanol in Methanol bei Raumtemperatur ergibt wie erwartet ein Produkt, das sich im DC wegen seiner ähnlichen hydrophoben Eigenschaften nicht von Puromycin unterscheidet (R_F-Wert 0.18).



Mit den beschriebenen Reaktionen und Analysen ist das Vorliegen von 5'-Bromacetylpuromycin (IVc) bewiesen.

5. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT PUROMYCINANALOGEN

Die dargestellten 5'-Derivate IVa-c des Puromycins sollen wie Puromycin (I) selbst die Rolle von Inhibitoren in der Proteinsynthese spielen und nach möglichst geringer Änderung der Struktur und damit der Affinität zum Puromycinbindungsort, der wahrscheinlich identisch mit der A-Region an der Peptidyltransferase ist, in derselben Weise gebunden werden.

5.1. Die poly U-abhängige Synthese von poly-Phenylalanin

Die einfachste Kontrolle der ribosomkatalysierten Reaktion von Puromycin mit wachsenden Peptidketten ist die poly U-abhängige poly-Phe-Synthese an zellfreien E.coli-Ribosomen. Dieses Experiment wurde von Nirenberg und Matthaei entwickelt (81-83) und enthält als Enzymsystem den S-30-Extrakt aus E.coli Zellen, die in der logarithmischen Phase des Wachstums geerntet werden. Nachdem die Zellwände mit Aluminiumoxid mechanisch und störende DNS enzymatisch zerstört worden sind, werden die Ribosomen und viele andere Zellbestandteile mit einer Pufferlösung versetzt. Durch Zentrifugation bei 30.000 g werden Ribosomen und Enzyme im Überstand (S-30) von den Zellen getrennt. In dieser Lösung sind auch alle RNS und Faktoren enthalten, die für die Proteinsynthese benötigt werden. Der folgende Versuch läuft in hoher Konzentration von monovalenten und Magnesiumionen bei einem pH-Wert um 7.8 ab. Zur Stabilisierung der Enyzmaktivität wird das Antioxydationsmittel DTT zugesetzt. Zur Beladung der tRNS mit ^{3}H-Phenylalanin werden ATP, für die Reaktionsschritte der Initiation und der Prolongation GTP und zur Regenerierung von ATP Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat zugegeben. Als mRNS dient synthetische Polyuridylsäure (poly U). Diese Reaktionsmischung wird mit verschiedenen Konzentrationen von Puromycin und seinen 5'-Analogen bei 37^{o}C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten werden Aliquots entnommen und mit 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Dabei werden alle Enzyme, die tRNS und das synthetisierte Polyphenylalanin ausgefällt. Durch Kochen des Niederschlags wird die Esterbindung zwischen tRNS und Phenylalanin gespalten, so daß die Radioaktivität der nicht umgesetzten, markierten Aminosäure nicht mehr im Niederschlag enthalten ist. Auf den Nitrozellulosefiltern werden also nur die poly-Phe-Ketten gesammelt und deren Radioaktivität gemessen. Zur Kontrolle werden auch Ansätze ohne poly U oder S-30 getestet; die gefundenen Untergrundwerte zeigen, daß keine poly-Phe-Synthesereaktion abläuft.

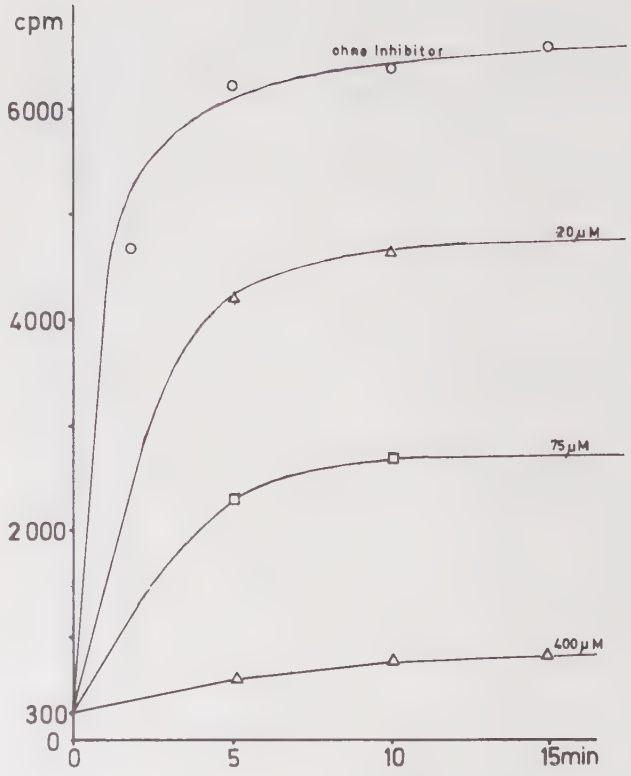


Fig. 3: Verlauf der poly-Phe-Synthese in Gegenwart von Puromycin (I).

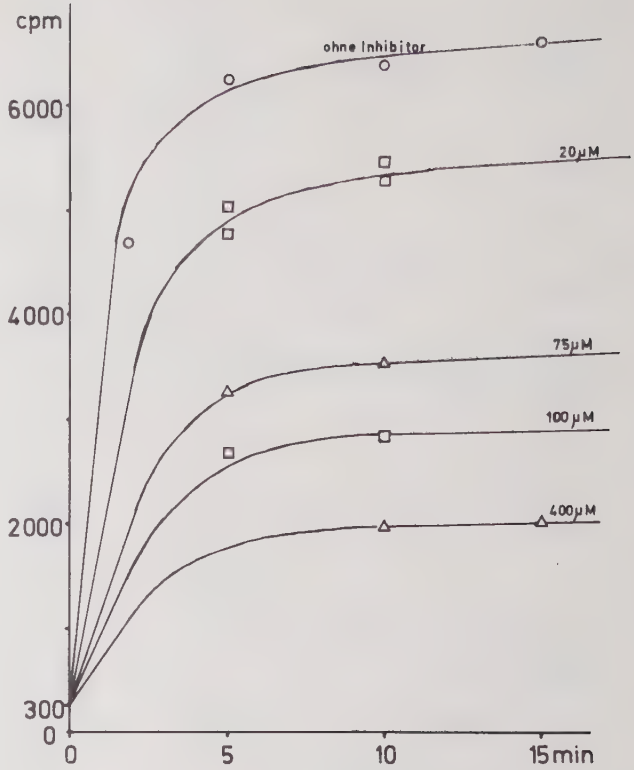


Fig. 4: Verlauf der poly-Phe-Synthese in Gegenwart von 5'-Acetylpuromycin (IVa).

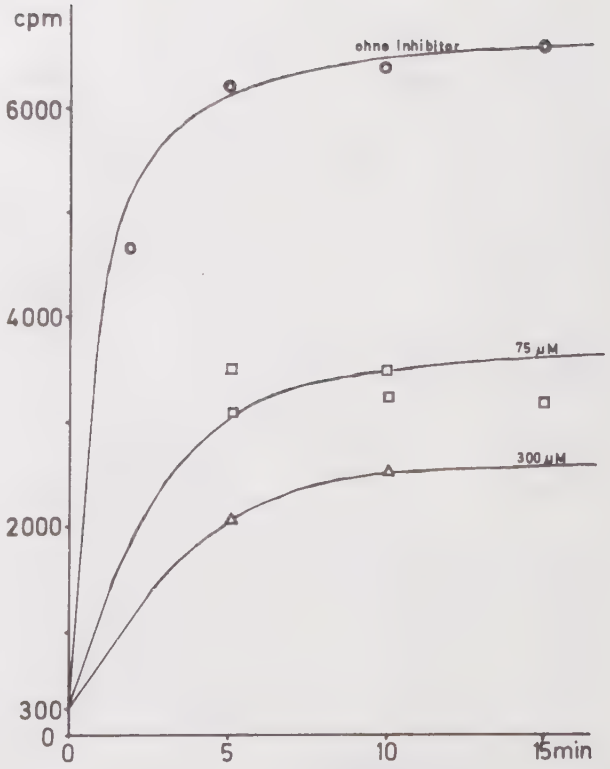


Fig. 5: Verlauf der poly-Phe-Synthese in Gegenwart von 5'-Chloracetyl-puromycin (IVb).

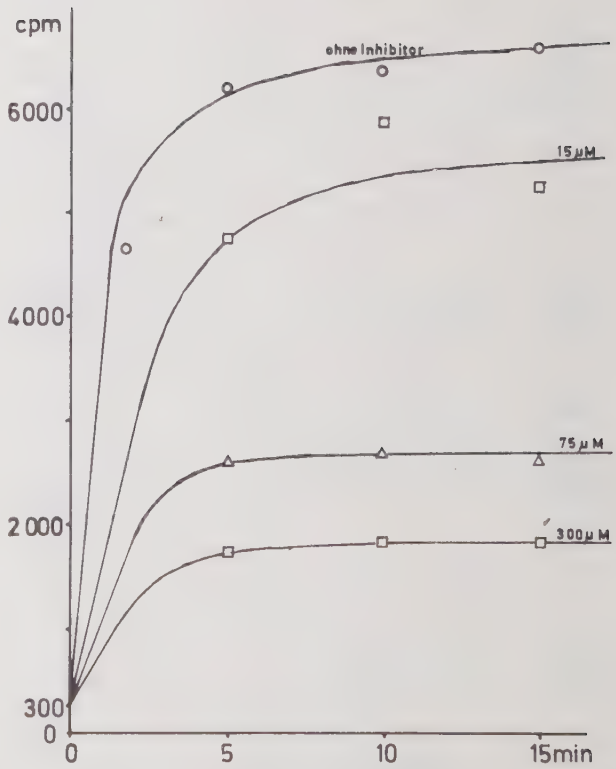


Fig. 6: Verlauf der poly-Phe-Synthese in Gegenwart von 5'-Bromacetyl-puromycin (IVc).

Die Meßergebnisse weisen oft Schwankungen auf und sinken nach 15 Minuten sogar teilweise. Das zeigt die Unvollkommenheit des Systems: Zuviele störende Enzyme sind noch in der Reaktionslösung vorhanden, die die Nukleinsäuren und Ribosomen und sogar die synthetisierten Polypeptidketten wieder abbauen. Die Diagramme sind deshalb nur bis zu 15 Minuten aufgezeichnet, in denen der normale Verlauf der Peptidsynthese gut erkennbar wird.

Um die unterschiedliche Aktivität der 5'-Analogen des Puromycins vergleichen zu können, wird die prozentuale Hemmung der poly-Phe-Synthese (0 % ≙ ungehemmte Synthese) aus den Diagrammen zwischen 10 und 15 Minuten ermittelt und in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tab. 4: Prozentuale Hemmung der poly U-abhängigen Synthese von poly-Phenylalanin durch 5'-Analoga von Puromycin. (Die beiden letzten Zeilen enthalten Vergleichszahlen von Symons et al. (58) und Nathans et al. (50)).

Konzentration (µM) der Inhibitoren:	10	15	20	30	75	100	300	400	1000
Ac-Puromycin			18		48	60		73	
Clac-Puromycin					51		64		
Brac-Puromycin		18			62		75		
Puromycin			29		63			91	
Puromycin (58)	17			46		78	94		
Puromycin (50)						73			95

Die Ergebnisse bei der Inhibition durch Puromycin stimmen ungefähr mit denen von Nathans und Symons überein. Man sieht deutlich, daß die Inhibitorwirkung

der Substanzen mit der Größe der Substituenten in der 5'-Acetylgruppe zunimmt. So weisen Acetyl- und Chloracetyl-puromycin ca. 73 % bzw. 77 % der Puromycinaktivität bei den verschiedenen Konzentrationen auf, und das Bromacetylderivat erreicht sogar 87 % dieser Aktivität.

Diese starke Hemmwirkung der untersuchten Verbindungen zeigt, daß die neu eingeführten Gruppen gut in den freien Raum passen, den bei der Anlagerung der Aminoacyl-tRNS normalerweise die 5'-Phosphatgruppe zum nächsten Nukleotid ausfüllen würde. Es tritt also keine sterische Hinderung auf und auch die elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen scheinen eine Anlagerung der Puromycinanalogen an der Bindungsstelle für Puromycin nicht zu beeinträchtigen.

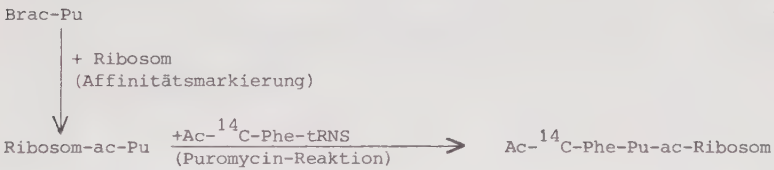
5.2. Versuche zur Affinitätsmarkierung

Mit der Hemmung der Polyphenylalaninsynthese durch 5'-Acyl-puromycin ist gezeigt worden, daß diese Verbindungen eine ähnliche Reaktion wie das Puromycin bewirken. Sie können deshalb für eine Affinitätsmarkierung der Puromycinhaftstelle am Ribosom benutzt werden.

Bei den bisherigen Arbeiten (43-45,47,84) mit Affinitätsmarkierungen sind die Ribosomen meist mit radioaktiven Antibiotikaderivaten inkubiert worden und anschließend durch Auftrennung der Ribosomenbestandteile mehrere Proteine als Reaktanten mit den Markierern identifiziert worden.

Dabei wurden wahrscheinlich auch Proteine markiert, die zwar eine gewisse Affinität zu den Antibiotika aufweisen, aber nicht unbedingt die spezifische

Bindungsstelle während ihrer Aktion am Ribosom darstellen. Da Puromycin nicht nur diese spezifische Bindungsstelle blockiert, sondern auch in bekannter Weise mit dem Substrat der Peptidyltransferase reagiert, kann man in diesem Fall gleichzeitig mit der Affinitätsmarkierung durch die Bromacetylgruppe auch eine Funktionskontrolle mit der freien Aminogruppe durchführen. Auf der einen Seite soll das Puromycinanaloge am Ribosom irreversibel gebunden werden, auf der anderen mit seiner Aminogruppe die Puromycin-Reaktion eingehen. Wenn das Substrat in der P-Region radioaktiv ist und nun indirekt über Puromycin an das Ribosom oder einen Teil davon gebunden wird, so ist tatsächlich die Haftstelle für das Antibiotikum während der Proteinsynthese spezifisch radioaktiv markiert:



Für diese spezifische Affinitätsmarkierung ist jedoch ein weniger komplexes und besser überschaubares System notwendig, als es ein S-30-Extrakt darstellt. Die Ribosomen müssen von allen störenden Faktoren befreit werden, indem sie nach einer abgewandelten Methode nach Staehelin et al. (85) gereinigt werden.

5.2.1. Präparation von Ribosomen

Ribonukleasefreie Escherichia coli A19-Zellen werden extrahiert und der S-30-Überstand isoliert. Der Extrakt wird auf eine Saccharoselösung mit hohem

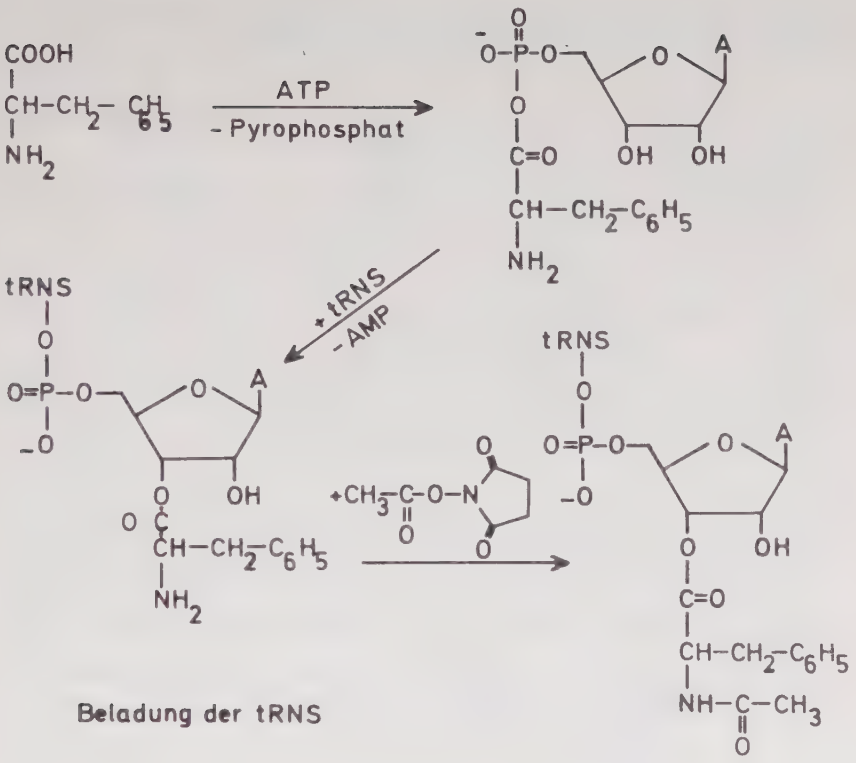
Ammoniumchloridgehalt aufgetragen und in der Ultrazentrifuge bei 105 000 g zentrifugiert. Der Überstand, der RNS, Faktoren und andere nicht ribosomale Enzyme enthält, wird abgetrennt und das Pellet nochmals durch Ultrazentrifugation auf ammoniumchloridhaltiger Zuckerlösung gereinigt. Das feste, klare Pellet der ribosomalen Bestandteile wird gewaschen und in Tris-Puffer tiefgefroren aufgewahrt.

Die durchzuführenden Versuche müssen unter möglichst natürlichen Bedingungen ablaufen und leicht identifizierbare Produkte liefern. Daher soll nur eine einzige Peptidbindung geknüpft werden; als Peptidyl-tRNS für die Besetzung der P-Region wird eine tRNS präpariert, die N-acetyliertes Phenylalanin trägt. Dieses System ist in den letzten Jahren oft zur Untersuchung der Proteinbiosynthese und der Bildung von Acetylphenylalanylpuromycin benutzt worden (27,49,60,64,86-91). Diese Reaktion, deren Anwendung von Leder et al. (92,93) mit Formylmethionin untersucht und von H. Weissbach et al. (26) mit Acetyl-Phenylalanin entwickelt worden ist, wird auch als Kontrolle in den folgenden Versuchen dienen.

5.2.2. Präparation der Träger-Ribonukleinsäure

Für die Beladung der P-Region wird eine tRNS benötigt, die eine N-geschützte Aminosäure trägt und als Donorsubstrat an der Peptidyltransferase fungiert.

Die phenylalaninspezifische $tRNS^{Phe}$ wird dazu im Tris-Puffer mit ^{14}C-markiertem Phenylalanin beladen, indem mit Kalium- und Magnesiumionen, ATP und Phe-tRNS-Synthetase, deren Thiolgruppen durch Mercaptoäthanol geschützt werden, bei $37^{o}C$ inkubiert wird.



Beladung der tRNS

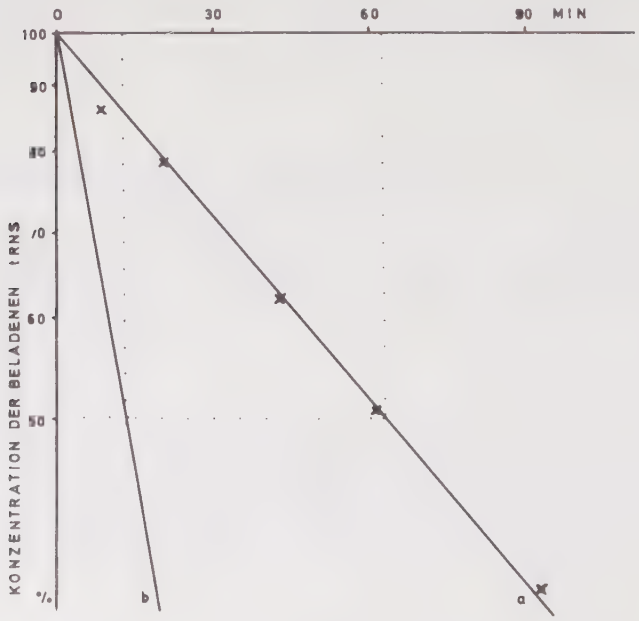
Zur Isolierung der beladenen tRNS wird das Enzym denaturiert und der Überstand nach Zentrifugation auf eine Sephadex-Säule zur Trennung von überschüssiger Aminosäure und ATP aufgetragen. Die erste Fraktion des Eluats wird eingeengt, und die tRNS kann mit hohen Äthanolkonzentrationen ausgefällt und gereinigt werden.

Nach Lapidot et al. (94) wird die Phe-tRNS mit N-Acetoxysuccinimid schonend und spezifisch an der endständigen Aminogruppe acetyliert, während nach der Methode von Haenni und Chapeville mit Essigsäureanhydrid auch andere Gruppen

Tab. 5: Alkalische Hydrolyse von N-Acetyl-Phe-tRNS

Inkubationszeit (min)	TCA-fällbare Radioaktivität (cpm)	(%)	Hydrolyse (%)
0	13 000	100	0
8	11 300	87	13
20	10 400	79.5	20.5
42	8 200	62.5	37.5
60	6 700	51.2	48.8
90	4 900	37.4	62.6

Fig. 7: Hydrolysegeschwindigkeit von a) N-Acetyl-Phe-tRNS (Die Hydrolysegeschwindigkeit von b) Phe-tRNS mit einer Halbwertszeit von 12.5 Minuten ist einer Arbeit von Sprinzl und Cramer (96) entnommen).



der tRNS angegriffen werden (86). Acetoxysuccinimid läßt sich leicht aus Essigsäure, N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexlycarbodiimid in Äthylacetat darstellen.

Phe-tRNS wird nur kurz in Triäthylaminpuffer bei pH 8.0 gelöst und muß sofort mit mehr als dem 2000-fachen Überschuß des Acetylierungsmittels versetzt werden (95). Im schwach alkalischen Medium wird die Esterbindung zwischen Phenylalanin und tRNS schnell hydrolysiert, während diese Bindung durch die Acetylierung der freien Aminogruppe stabilisiert wird (vergl. 3.3.). N-Acetyl-Phe-tRNS wird wie Phe-tRNS durch mehrmaliges Ausfällen mit Äthanol gereinigt. Die Ausbeute nach Beladung und Acetylierung beträgt ca. 54 %. An der geringeren Hydrolysegeschwindigkeit der Esterbindung läßt sich zeigen, daß die Phe-tRNS acetyliert worden ist: Ac-^{14}C-Phe-tRNS wird in Tris-Puffer bei pH 9.0 und 37^{o}C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten werden Aliquot-Proben entnommen, und die darin enthaltene tRNS mit 5 %iger TCA kalt gefällt, ohne daß der Ester gespalten wird, der während der Inkubationszeit nicht hydrolysiert wurde. Nach Filtrieren und Messen des radioaktiven Gehalts der Proben läßt sich eine Halbwertszeit von 62.5 Minuten ermitteln (vergl. Tab. 5 und Fig. 7), die mit Messungen von de Groot, Lapidot et al. übereinstimmt (95). - Acetyl-Phe-tRNS wird in alkoholischer Suspension im Eisschrank aufbewahrt.

5.2.3. Peptidyltransferase-Versuche

Die Reaktionen an der Peptidyltransferase werden mit 5'-Chloracetyl- oder Bromacetylpuromycin, mit poly U als mRNS und der beladenen tRNS in einem Ionenpuffer bei pH 7.8 und Raumtemperatur 40 Minuten lang durchgeführt. Als Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Ribosomen soll Puromycin in der gleichen

Konzentration wie seine Analogen mit Ac-^{14}C-Phe-tRNS reagieren. Das Produkt dieser Reaktion, Ac-^{14}C-Phe-Pu, ist zwischen pH 4 und pH 6 selektiv aus der Reaktionslösung mit Äthylacetat extrahierbar und der Reaktionsverlauf daher leicht zu messen.

$$\text{Pu} + \text{Ac-}^{14}\text{C-Phe-tRNS} \xrightarrow{\text{Puromycinreaktion}} \text{Ac-}^{14}\text{C-Phe-Pu} + \text{tRNS}$$

Die 5'-Halogenacetylpuromycine sind in Wasser sehr schlecht löslich; sie werden deshalb in 10 µl Methanol gelöst eingesetzt. So enthält der Reaktionsansatz auch 10 % Methanol, das jedoch noch nicht die Strukturumwandlung im Ribosom bewirkt, die bei 33 % Alkohol in der Fragment-Reaktion auftreten (28,97,98). Wie Ac-^{14}C-Phe-Pu ist auch Halogenacetyl-^{14}C-Phe-Pu leicht aus der Reaktionslösung extrahierbar; ist aber das Halogenatom durch ein Protein substituiert, so ist dieser Komplex nicht mehr in Äthylacetat löslich.

Tab. 6: Äthylacetat-Extraktion des Reaktionsproduktes (cpm) aus Puromycin und seinen Analogen mit Ac-^{14}C-Phe-tRNS (Ribosom:Pu:tRNS = 6:35:0.12).

1. Versuch	mit Puromycin	1971
	mit Chloracetylpuromycin	1831
	ohne Ribosomen, mit Puromycin	408
2. Versuch	mit Puromycin	1956
	mit Bromacetylpuromycin	1390
	ohne Ribosomen, mit Puromycin	1014

Werden die Ribosomen mit poly U und Halogenacetylpuromycin schon eine Stunde bei 37°C präinkubiert, erhält man die gleichen Meßwerte.

Bei diesen Reaktionen wird ein großer Überschuß an Ribosomen eingesetzt, da nur ein Bruchteil von ihnen genügend Aktivität zeigt. Aus Tabelle 6 kann man erkennen, daß das Chloracetylpuromycin ähnlich wie Puromycin gewirkt hat; eine Reaktion des Chloratoms mit dem Ribosom scheint nicht eingetreten zu sein (zu hoher cpm-Wert). Beim Bromacetylpuromycin liegt der Wert erheblich niedriger. Da in den vorangegangenen Untersuchungen die Puromycinaktivität des Bromacetylanalogen sehr hoch liegt, kann man diesen Wert nur so erklären, daß das Bromatom reagiert hat und das Produkt Ac-^{14}C-Phe-Pu-ac-Ribosom nicht extrahiert worden ist.

Zur weiteren Untersuchung dieser Reaktion bietet sich eine andere Aufarbeitungsmethode des Reaktionsansatzes nach Ringer et al. (99) an. Es werden dieselben Komponenten wie bei der oben beschriebenen Reaktion eingesetzt und bei 37°C inkubiert. Zu Beginn des Versuchs, nach 10 und 30 Minuten werden Proben der Lösungen mit Rinderserumalbumin (zur besseren Fällbarkeit der Proteine) versetzt und mit Trichloressigsäure unter Eiskühlung alle Proteine und Nukleinsäuren ausgefällt. Die Radioaktivität des Niederschlags wird gemessen.

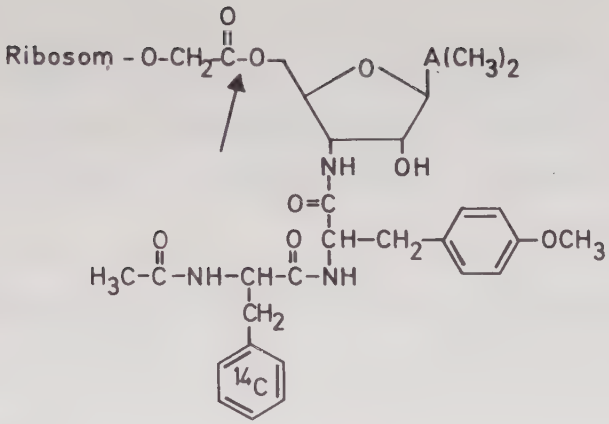
In Tabelle 7 sieht man, daß mehrere gleichzeitig verlaufende Reaktionen die cpm-Werte beeinflußt haben. Ohne Inhibitoren und ohne Ribosomen fallen die Werte wegen der Hydrolyse der Esterbindung zwischen Ac-^{14}C-Phe und tRNS, da die acylierte Aminosäure nicht im Filter festgehalten wird. Die Puromycin-Reaktion unter Bildung von Ac-^{14}C-Phe-Pu senkt die Werte noch schneller. Bei Bromacetylpuromycin fallen die Werte nicht so schnell wie bei Puromycin. Da sich Puromycin und sein Bromacetylderivat jedoch nicht wesentlich in ihrer

Tab. 7: TCA-Fällung bei $0^{\circ}C$ nach Reaktion von Puromycin und Bromacetylpuromycin mit Ac-^{14}C-Phe-tRNS (Ribosom:Pu:tRNS = 6:45:0.026). Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Wert bei 0 min (= 100 %).

Inkubationszeit TCA-fällbare Radioaktivität	0 min cpm	10 min cpm (%)	30 min cpm (%)
ohne Inhibitor	9175	6963 (76)	6212 (68)
ohne Ribosomen, mit Puromycin	6739	4812 (71)	4032 (60)
mit Puromycin	6786	1184 (17)	791 (11)
mit Bromacetylpuromycin	8062	5786 (72)	4398 (54)
mit Brac-Pu (1 Std. präinkubiert)	7395	5211 (70)	3577 (48)

Puromycinaktivität unterscheiden, müßte das langsamere Absinken der Werte beim Bromacetylanalogen auf der Reaktion mit Ribosomen beruhen, die im Filter aufgefangen werden. Unerklärlich ist, daß die Präinkubation der Ribosomen mit Bromacetylpuromycin keinen Effekt zeigt. Die cpm-Werte sollten hier höher liegen. Da die Hydrolyse einen Vergleich der Werte sehr erschwert, wurde eine Methode gesucht, die es erlaubt, nur den eventuell gebildeten Ribosom-ac-Pu-Ac-^{14}C-Phe-Komplex zu isolieren.

Durch Kochen des TCA-gefällten Niederschlags wird zwar die Ac-Phe-tRNS vollständig hydrolysiert. Gleichzeitig wird aber auch die Esterbindung der Affinitätsmarkierung gespalten.



Auf diese Weise ist das markierte Produkt also nicht von der ungespaltenen Ac-Phe-tRNS zu trennen. Deshalb wird Ac-^{14}C-Phe-tRNS vor der TCA-Fällung mit Ribonuklease A aus Pankreas gespalten, so daß nur noch Proteine im Filter enthalten sein können, von denen nur die markierten gemessen werden. Die Bedingungen während der Inkubation sind dieselben wie im vorherigen Versuch.

Tab. 8: TCA-Fällung (cpm) bei 0°C nach Reaktion von Puromycin und Bromacetylpuromycin mit Ac-^{14}C-Phe-tRNS und Ribonukleasebehandlung (Ribosom:Pu:tRNS = 6:45:0.026).

Inkubationszeit	0 min	10 min	30 min
ohne Inhibitor	70	59	66
ohne Ribosomen, mit Puromycin	62	67	64
mit Puromycin	88	70	64
mit Bromacetylpuromycin	89	70	96
mit Brac-Pu (1 Std. präinkubiert)	52	58	81
mit Brac-Pu (3 Std. präinkubiert)	66	71	46

In Tabelle 8 sollten nur in den ersten drei Zeilen Untergrundwerte erscheinen. Bei Bromacetylpuromycin sollten die Werte mit einer Reaktion am Ribosom und gleichzeitiger Puromycin-Reaktion ansteigen. Es ist jedoch keine Tendenz in den Werten zu erkennen. So wurde dieser Versuch noch einmal mit veränderten Bedingungen durchgeführt. Die Konzentration der Ribosomen wird verdoppelt und im Puffer (Mix 2) ist kein DTT mehr zur Stabilisierung von Enzymthiolgruppen vorhanden, da DTT mit seinen Thiolgruppen auch einen guten unspezifischen Reaktionspartner für Bromacetylgruppen darstellt. Die Versuche mit Bromacetylpuromycin werden bis zu einer Dauer von 2 1/4 Stunden präinkubiert.

Tab. 9: Peptidyltransferase-Versuch ohne DTT:TCA-Fällung (cpm) nach Ribonukleasebehandlung (Ribosom:Brac-Pu:tRNS = 12:45:0.026).

Präinkubationszeit (min)	Inkubationszeit (min)	0	10	35	60	120	360
0	ohne Ribonuklease	7895	7077	5249	4365	3105	1197
0	ohne Inhibitor	92	89	75	79	-	-
0	mit Puromycin	84	74	75	83	-	-
0	mit Bromacetyl-Pu	90	98	90	101	-	-
15		79	102	129	129	123	180
30		73	84	100	141	-	-
45		74	92	95	100	-	114
90		94	81	101	116	-	-
135		75	-	86	94	114	112

Die erste Zeile von Tabelle 9 zeigt die normale Hydrolyse der beladenen tRNS an. Die Versuche ohne Inhibitor und mit Puromycin zeigen wie erwartet Untergrundwerte. Bei den Versuchen mit Bromacetylpuromycin sollten die Werte mit den Präinkubationszeiten anwachsen. Ein Ansteigen mit der Inkubationszeit müßte den Verlauf der Puromycin-Reaktion nach der Markierung am Ribosom dar-

stellen. Die ansteigende Tendenz ist zwar bei allen Bromacetylpuromycin-Versuchen erkennbar, am besten bei Präinkubationszeiten von 15 und 30 Minuten, aber die Ausbeute an markiertem Material ist völlig unbefriedigend (ca. 2 %). Eine Affinitätsmarkierung von ribosomalen Proteinen ist also nicht erreicht worden.

Wenn die Puromycinanalogen reversibel an eine ganz spezifische Haftstelle gebunden werden, hat auch die 5'-Halogenacetylgruppe nur einen begrenzten, spezifischen Aktionsradius für die irreversible Bindung mit dem Ribosom. Eine Erklärung für das Fehlschlagen der Affinitätsmarkierung kann also sein, daß der Ort, den die Bromacetylgruppe in der Puromycinhaftstelle ausfüllt, gar keine erreichbare reaktive Gruppe für eine Substitutionsreaktion enthält.

Ein anderer Grund dafür, daß keine Markierung nachgewiesen wird, kann die Reaktion der Bromacetylgruppe mit Aminogruppen von Adenosin oder Guanosin in der rRNS sein. Diese Markierung ist jedoch nicht nachzuweisen, da rRNS durch die Ribonukleasebehandlung gespalten wird und die Spaltstücke nicht mehr mit TCA fällbar sind.

Mit diesen biologischen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß mit 5'-Halogenacetylpuromycin in der A-Region kein ribosomales Protein markiert werden kann. Eine Markierung der ribosomalen RNS ist nach den Werten in den Tabellen 6 und 7 jedoch nicht auszuschließen.

6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Als potentielle Reagenzien für die Affinitätsmarkierung ribosomaler Proteine wurden 5'-Bromacetyl- und 5'-Chloracetylpuromycin dargestellt.

3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin, das als Modellverbindung für Reaktionen zur Synthese dieser Substanzen dienen sollte, erwies sich als zu instabil wegen der leichten Hydrolyse der Esterbindung. Die Synthese erfolgte durch Kopplung von N-carbobenzoxy-geschütztem Phenylalanin und 5'-Methoxytrityl-2'-desoxyadenosin mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel und anschließender Abspaltung der Schutzgruppen durch Behandlung mit Essigsäure und katalytische Hydrierung.

Der Einsatz der Chloracetylgruppe zur selektiven Blockierung der 5'-Hydroxygruppe in 2'-Desoxyadenosin scheiterte wegen der zu großen Reaktionsfähigkeit des Chloressigsäureanhydrids.

Zur Darstellung von 5'-Acetyl- und 5'-Chloracetylpuromycin wurde die reaktive freie Aminogruppe des Puromycins mit der Carbobenzoxygruppe blockiert. Die Einführung der Acetyl- bzw. Chloracetylgruppe durch die Anhydride erfolgte gleichzeitig an den 5'- und 2'-Hydroxygruppen. Die 2'-O-Acylgruppen konnten jedoch durch Behandlung mit methanolischer Ammmoniaklösung selektiv entfernt werden, so daß nach Abtrennung der N-Cbo-Gruppe durch katalytische Hydrierung 5'-Acetyl- und 5'-Chloracetylpuromycin in Ausbeuten von 36 bzw. 28 % erhalten wurden.

Der Syntheseweg zum 5'-Bromacetylpuromycin mußte modifiziert werden, da die Bromacetylgruppe bei der Hydrierung reduziert wurde. Die Aminogruppe des

Puromycins wurde daher mit der t-Butyloxycarbonylgruppe blockiert, die mit Trifluoressigsäure leicht abzuspalten war. Bei der Synthese des 5'-Bromacetylpuromycins wurde ein Reaktionsschritt eingespart, da die selektive Bromacetylierung der 5'-Hydroxygruppe möglich war. Die Gesamtausbeute beträgt dennoch wegen der schwierigen Bromacetylierung nur ca. 20 %.

Während der poly U-abhängigen Synthese von Polyphenylalanin wurde für 5'-Acetyl-, 5'-Chloracetyl- und 5'-Bromacetylpuromycin eine Inhibitorwirkung von ca. 73, 77 bzw. 87 % der Puromycinaktivität ermittelt.

In der poly U-abhängigen Synthese von N-Acetylphenylalanylpuromycin wurde Puromycin durch sein 5'-Bromacetylderivat ersetzt. Die Affinitätsmarkierung eines ribosomalen Proteins in der A-Region der Peptidyltransferase durch die Reaktion mit der Bromacetylgruppe mit radioaktivem N-Acetylphenylalanin an der tRNS war nicht möglich.

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1. Allgemeines

Dünnschichtchromatographie wurde auf DC-Mikrokarten SIF (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, 5 x 10 cm, Riedel-de Häen) und mit Chloroform/Methanol 9 : 1 (v/v) als Laufmittel durchgeführt. Alle angegebenen R_F-Werte beziehen sich auf dieses System.

Zum Nachweis von Monomethoxytritylgruppen wurden die Chromatogramme mit 10 %iger wässriger Perchlorsäure besprüht und kurz erhitzt. Substanzen mit freien Aminogruppen wurden durch Besprühen mit Ninhydrin-Sprühreagenz 0.1 %

(Merck) und anschließende Erwärmung auf 110°C bis zur optimalen Farbentwicklung der Flecken nachgewiesen.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60, Korngröße 0.063-0.200 mm (Merck) verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit einer 4 cm hohen Seesandschicht am Boden versehen und dann mit in Chloroform suspendiertem Kieselgel aufgefüllt. Eluiert wurde mit Chloroform-Methanol-Gemischen an einem mit UV-cord ausgestatteten Fraktionssammler. Fraktionen von 15 ml wurden gesammelt.

Die präparative Schichtchromatographie wurde auf PSC-Fertigplatten (Kieselgel F 254, 20 x 20 cm, Schichtdicke 2 mm, Merck) und mit Chloroform/Methanol als Laufmittel ausgeführt. Die gewünschten UV-aktiven Zonen wurden ausgekratzt und auf eine am Boden mit 4 cm Seesand beschichteten Säule (Ø 1.5 cm, h 25 cm) gefüllt, die Produkte mit Chloroform/Methanol 1:1 eluiert und am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingedampft.

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind unkorrigiert. Die UV-Spektren wurden in Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg im Cary 16 Spektrometer aufgenommen; als Lösungsmittel diente Methanol.

Die Messungen der ^{1}H-NMR-Spektren führte Herr B. Seeger an einem Bruker-60 MHz-Kernresonanzspektrometer HX60 durch. Als Lösungsmittel dienten d-Methanol und d-Chloroform, als innerer Standard Tetramethylsilan. Szintillationsmessungen wurden am Packard-Tricarb 2450 liquid scintillation Spektrometer ausgeführt.

Die Massenspektren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Schiebel (Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung, Stöckheim) gemessen.

Puromycindihydrochlorid wurde von Biomol Biochemica-Service, E. Barth (Ilvesheim), 2'-Desoxyadenosin von Schwarz/Mann (Orangeburg, New York), N-Cbo-L-Phenylalanin von E. Merck (Darmstadt) und ^{14}C-L-Phenylalanin von The Radiochemical Centre (Amersham) bezogen.

Bei den Transferase-Versuchen wurden folgende Puffer benutzt:
Mix 1: 0.5 M Tris-HCl pH 7.8, 1.0 M NH_4Cl, 0.5 M KCl, 0.1 M $MgCl_2$, 0.01 M DTT
Mix 2: 0.5 M Tris-HCl pH 7.8, 1.0 M NH_4Cl, 0.5 M KCl, 0.1 M $MgCl_2$.

E.coli-Zellen A19 wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. H. Küntzel und $tRNS^{Phe}$ von Herrn Dr. M. Sprinzl zur Verfügung gestellt.

7.2. Derivate von 2'-Desoxyadenosin

7.2.1. 3',5'-Dichloracetyl-2'-desoxyadenosin (XIb)

376 mg 2'-Desoxyadenosin (1.5 mMol) werden durch mehrmaliges Abziehen mit absolutem Pyridin getrocknet und mit 171 mg Chloressigsäureanhydrid (1 mMol, Fluka) versetzt. Unter Eiskühlung werden langsam einige Tropfen abs. Pyridin zugegeben und weiter bei 0° gerührt. Nach zwei und vier Stunden wird nochmals je 1 mMol Chloracetanhydrid zugegeben. Der Umsatz wird durch DC kontrolliert. Nach Beendigung der Reaktion nach fünf Stunden wird zur Hydrolyse des restlichen Anhydrids Eiswasser zugegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Das zur Trockne eingedampfte Rohprodukt wird in Chloroform aufgenommen, zweimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, wieder eingedampft und aus Äthanol zu farblosen Prismen umkristallisiert.

Ausbeute 280 mg (46 % der Theorie)

Schmp. 143°C (Braunfärbung)

λ_{max} 258 nm

NMR (d-DMSO) δ = 4.48 2H,s Clac

δ = 4.51 2H,s Clac

$C_{14}H_{15}N_5O_5Cl_2$ (404)

Ber. C 41.58 H 3.71 N 17.32 Cl 17.57

Gef. C 41.78 H 3.74 N 17.22 Cl 17.36

R_F-Wert 0.55

7.2.2. 3',5'-Diacetyl-2'-desoxyadenosin (XIa)

66 mg (0.26 mMol) Desoxyadenosin (getrocknet) werden bis zur vollständigen Lösung bei Raumtemperatur in 0.5 ml Acetanhydrid und 0.7 ml Pyridin gerührt. Nach 30 Minuten ist die Reaktion beendet. Durch Kodestillation mit Wasser wird überschüssige Essigsäure entfernt und das Produkt aus einer Chloroformlösung mit Petroläther ausgefällt. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol erhält man farblose Nadeln.

Ausbeute 80 mg (91 % der Theorie)

Schmp. 152 - 153°C (Lit. (100) 150 - 151°C)

R_F-Wert 0.55

7.2.3. 5'-Methoxytrityl-2'-desoxyadenosin (VIII)

502 mg 2'-Desoxyadenosin (2 mMol) werden durch mehrmaliges Abziehen mit abs. Pyridin getrocknet und anschließend in 30 ml warm gelöst. Nach Zugabe von 679 mg Mono-p-methoxy-triphenylmethylchlorid (2.2 mMol) wird drei Tage lang

im Dunkeln bei Raumtemperatur im luftdicht verschlossenen Kolben gerührt. Überschüssiges Methoxytritylchlorid wird durch Methanol-Zugabe zerstört und die Lösung im Vakuum eingedampft, in Chloroform aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Danach wird mit Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und das Rohprodukt auf einer Kieselgelsäule gereinigt (Säule 2 x 40 cm, je 1.5 l Chloroform und Chloroform/Methanol (9:1), linearer Gradient). Die zweite große Fraktion läuft im DC mit dem R_F-Wert 0.32.

Beim Eindampfen entsteht ein weißer Schaum, der sich leicht pulverisieren läßt.

Ausbeute 638 mg (61 % der Theorie)

Schmp. 85°C (Blasenbildung)

λ_{max} 258 nm und 232 nm (CH_3OH)

NMR ($CDCl_3$)	δ = 2.60	2H,m	2'-CH_2
	δ ~ 3.00	1H,s	3'-OH
	δ = 3.40	2H,d	5'-CH_2
	δ = 3.77	3H,s	-OCH_3
	δ = 4.20	1H,m	4'-CH
	δ = 4.70	1H,m	3'-CH
	δ ~ 6.00	2H,s	6-NH_2
	δ = 6.45	1H,t	1'-CH
	δ = 6.7-7.5	14H,m	Trityl
	δ = 7.95	1H,s	2-CH
	δ = 8.25	1H,s	8-CH

$C_{30}H_{29}N_5O_4$ (523)

Ber.	C 68.83	H 5.54	N 13.38	OCH_3	5.94
Gef.	C 68.88	H 5.54	N 13.37	OCH_3	5.93

7.2.4. 5'-Methoxytrityl-3'-(N-Cbo-phenylalanyl)-2'-desoxyadenosin (IX)

Zu 299 mg N-Carbobenzoxyphenylalanin (1 mMol) und 309 mg Dicyclohexlycarbodiimid (1.5 mMol) in 30 ml abs. Pyridin werden 262 mg trockenes 5'-Methoxytrityl-2'-desoxyadenosin (VIII) (0.5 mMol) gegeben und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mit DC kontrolliert. Zur Beendigung der Reaktion wird 1 ml Methanol zugegeben und eingedampft. Bei der anschließenden säulenchromatographischen Auftrennung (Kieselgelsäule 2 x 40 cm, je 1.5 l Chloroform und Chloroform/Methanol (9:1), linearer Gradient) erhält man vier Fraktionen:

1.) N-Cbo-phenylalaninmethylester, R_F-Wert 0.80

λ_{max} 257, 251, 262, 245 nm (CH_3OH)

2.) 5'-Methoxytrityl-3'-(N-Cbo-phe)-2'-desoxyadenosin (IX)

Ausbeute 458 mg (57 % der Theorie)

R_F-Wert 0.68

λ_{max} 258 nm und 232 nm (CH_3OH)

NMR ($CDCl_3$) δ = 3.12 2H,d Phe

$\delta \sim$ 4.60 1H Phe

δ = 5.12 2H,s Cbo

$\delta \sim$ 5.50 1H 3'-CH

δ = 6.7-7.5 24H Phe+Cbo+Trityl

$C_{47}H_{44}N_6O_7$ (804)

Ber. C 70.15 H 5.47 N 10.45 OCH_3 3.86

Gef. C 70.15 H 5.60 N 10.15 OCH_3 3.86

3.) 3'-(N-Cbo-phe)-2'-desoxyadenosin, R_F-Wert 0.38

λ_{max} 258 nm (CH_3OH), NMR wie XVI

4.) Ausgangsprodukt: Methoxytrityldesoxyadenosin (VIII)

R_F-Wert 0.32, 97 mg (37 %)

7.2.5. 3'-N-Cbo-phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (XVI)

165 mg (0.2 mMol) 5'-Methoxytrityl-3'-N-Cbo-phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (IX) werden 6 Stunden in 80 %iger wässriger Essigsäure bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zur Trockne eingedampft. Auf zwei präparativen Kieselgelplatten wird das Produkt mit Chloroform/Methanol (3:1) vom schneller laufenden Tritylalkohol abgetrennt. Das gewünschte Produkt wird ausgekratzt und mit Chloroform eluiert. Durch Lösen des Produktes in Chloroform und Zusatz von wenig Wasser erhält man einen farblosen Niederschlag, der im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet wird.

Ausbeute 104 mg (95 % der Theorie)

Schmp. 92°C

R_F-Wert 0.40

NMR ($CDCl_3$) $\delta \sim 3.85$ 2H 5'-CH_2

$\delta \sim 3.95$ 1H 4'-CH

$\delta = 5.50$ 1H 3'-CH

Die Signale der Tritylgruppe fehlen.

Die Zuckerprotonen 3',4' und 5' sind durch Doppelresonanzspektren gesichert.

$C_{27}H_{28}N_6O_6$ (532)

Ber. C 60.90 H 5.26 N 15.78

Gef. C 60.82 H 5.42 N 15.69

7.2.6. 5'-Methoxytrityl-3'-phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (XVII)

81 mg (0.1 mMol) 5'-Methoxytrityl-3'-(N-Cbo-phenylalanyl)-2'-desoxyadenosin (IX) werden in 20 ml Methanol mit Palladium auf Aktivkohle (50 mg) unter Schütteln katalytisch hydriert. Nach 90 Minuten wird der Katalysator abfil-

triert, die Lösung eingedampft und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgelsäule 1.5 x 30 cm, je 0.8 l Chloroform und Chloroform/Methanol (9:1), linearer Gradient). Ein Nebenprodukt (1. Fraktion, R_F-Wert 0.34) wird nicht weiter untersucht. Das Hauptprodukt (2. Fraktion, R_F-Wert 0.30) zerfällt langsam in Desoxyadenosin, Tritylverbindungen und Phenylalanin. Es zeigt positive Trityl- und Ninhydrinproben.

NMR ($CDCl_3$)	δ = 3.00	2H,d	Phe
	δ = 3.40	2H,d	5'-CH_2
	δ = 3.80	3H,s	-OCH_3
	δ = 5.46	1H,d	3'-CH

Die Signale der Cbo-Gruppe fehlen.

7.2.7. 3'-Phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (X)

53 mg (0.1 mMol) 3'-N-Cbo-phenylalanyl-2'-desoxyadenosin (XVI) werden in 20 ml Methanol gelöst und 90 Minuten lang mit Palladium auf Aktivkohle (50 mg) unter Schütteln katalytisch hydriert. Das Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsproduktes zeigt nur eine einzige Zone (R_F-Wert 0.20) mit positiver Ninhydrinprobe.

λ_{max} 258 nm

In methanolischer Lösung bilden sich Desoxyadenosin (R_F-Wert 0.10), Phenylalanin, dessen Methylester und eine nicht weiter untersuchte Substanz (R_F-Wert 0.24).

7.3. Derivate von Puromycin

7.3.1. N-Carbobenzoxypuromycin (IIa)

544 mg Puromycindihydrochlorid (1 mMol) werden in 200 ml 2n-Ammoniak gelöst bzw. suspendiert, das freie Puromycin I mehrmals im Schütteltrichter mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformphase mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Puromycin wird möglichst weitgehend in Dioxan gelöst und mit einem Tropfen Pyridin und 156 µl Carbobenzoxychlorid (1.1 mMol, d = 1.2) versetzt. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur und Zugabe von wenigen Tropfen Wasser zum Lösen des entstandenen Niederschlags wird die Lösung eingedampft, in Chloroform mit enigen Tropfen Methanol gerade gelöst und auf eine Kieselgelsäule gegeben (3 x 50 cm, je 1 l $CHCl_3$ und $CHCl_3/CH_3OH$ (97:3), danach je 1 l $CHCl_3/CH_3OH$ (97:3) und $CHCl_3/CH_3OH$ (80:20). Als einzelne Fraktionen erhält man nacheinander Dicarbobenzoxypuromycin IIc (5 %), Carbobenzoxypuromycin IIa und zu 45 % nicht umgesetztes Puromycin. N-Carbobenzoxypuromycin IIa wird zu einem farblosen Schaum eingedampft und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute 275 mg (45 % der Theorie)

Schmp. 213°C

R_F-Wert 0.66

λ_{max} 275 nm (ε = 19.000)

NMR ($CDCl_3$ + 10 % CD_3OD)	δ = 2.96	2H,d	ß-CH_2 (J = 7.5 Hz)
	δ = 3.50	6H,s	$N(CH_3)_2$
	δ = 3.75	3H,s	OCH_3
	$\delta \sim$ 3.80	2H	5'-CH_2
	$\delta \sim$ 3.82	1H	4'-CH
	$\delta \sim$ 4.30	1H	3'-CH
	$\delta \sim$ 4.42	1H	2'-CH

δ ~ 4.45	1H	α-CH
δ = 5.05	2H,s	Cbo
δ = 5.72	1H,d	1'-CH
δ = 6.98	4H,q	Phe (J = 10.5 Hz)
δ = 7.30	5H,s	Cbo
δ = 8.18	2H	Purin

$C_{30}H_{35}N_7O_7$ (605)

Ber. C 59.50 H 5.79 N 16.20 OCH_3 5.12

Gef. C 59.68 H 6.02 N 16.42 OCH_3 5.18

7.3.2. N,5'-Dicarbobenzoxypuromycin (IIc)

Als Nebenprodukt bei der Darstellung von Carbobenzoxypuromycin (IIa) oder als Hauptprodukt beim Einsatz von 2,2 Äquivalenten Chlorameisensäurebenzylester erhält man Dicarbobenzoxypuromycin IIc. Aus Äthanol gewinnt man farblose Kristalle.

Schmp. 174°C

R_F-Wert 0.78

λ_{max} 277 nm ($CHCl_3$)

NMR ($CDCl_3$)	δ = 5.05	2H,s	N-Cbo
	δ = 5.20	2H,s	5'-Cbo
	δ = 7.32	5H,s	Cbo
	δ = 7.40	5H,s	Cbo

$C_{38}H_{41}N_7O_9$ (738)

Ber. C 61.70 H 5.54 N 13.26

Gef. C 61.54 H 5.50 N 13.26

7.3.3. 2',5'-Diacetyl-N-Cbo-puromycin (XVIIIa)

60 mg N-Cbo-puromycin IIa (0.1 mMol) werden durch leichtes Erwärmen in 6 ml Essigsäureanhydrid und drei Tropfen Pyridin gelöst. Nach 30 Minuten wird die Lösung eingedampft, in Chloroform gelöst, dreimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, wieder eingedampft und aus Methanol zu farblosen Nadeln umkristallisiert.

Ausbeute 65 mg (95 % der Theorie)

Schmp. 206°C

R_F-Wert 0.81

NMR ($CDCl_3$) δ = 2.08 6H,s 2x ac

δ = 5.10 2H,s Cbo

δ = 7.35 5H,s Cbo

$C_{34}H_{39}N_7O_9$ (689)

Ber. C 59.22 H 5.66 N 14.22

Gef. C 59.28 H 5.66 N 14.26

7.3.4. 5'-Acetyl-N-Cbo-puromycin (IIIa)

62 mg Diacetyl-Cbo-puromycin (XVIIIa) (0.09 mMol) werden in 25 ml Methanol und wenigen Tropfen Chloroform durch vorsichtiges Erwärmen gelöst und mit 2,5 ml 2n-Ammoniak versetzt. Nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird eingedampft und das Produkt IIIa auf einer Säule (Kieselgel, 1.5 x 30 cm, je 0.8 l Chloroform und Chloroform/Methanol (19:1), linearer Gradient) vom Ausgangsprodukt XVIIIa und Carbobenzoxypuromycin (IIa) getrennt. Aus Äthanol erhält man farblose Kristalle.

Ausbeute 47 mg (80 % der Theorie)

Schmp. 199°C

R_F-Wert 0.78

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ = 2.20 3H,s ac

Das zweite Acetylsignal fehlt.

$C_{32}H_{37}N_7O_8$ (647)

Ber. C 59.35 H 5.72 N 15.15

Gef. C 59.44 H 5.69 N 15.18

7.3.5. 5'-Acetylpuromycin (IVa)

65 mg 5'-Acetyl-N-Cbo-puromycin (IIIa) (0.1 mMol) lösen sich schwer in 30 ml 15 %iger methanolischer Essigsäure. Mit 50 mg Palladium auf Aktivkohle wird die Mischung zwei Stunden lang unter Schütteln katalytisch hydriert bis sich die gesamte Substanz gelöst hat. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird durch mehrmalige Kodestillation mit Wasser bei 2 Torr die überschüssige Essigsäure entfernt und mit Petroläther die dünnschichtchromatographisch reine Substanz IVa aus einer Chloroformlösung ausgefällt. Kristallisationsversuche schlugen fehl.

R_F-Wert 0.30

λ_{max} 277 nm

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD, 1:1) δ = 2.15 3H,s ac

Die Signale der Carbobenzoxygruppe fehlen.

Die Ninhydrinprobe ist positiv.

7.3.6. N,2',5'-Triacetylpuromycin (XIXa)

a) 15 mg 5'-Acetylpuromycin (IVa) wird in 5 ml Essigsäureanhydrid bei Raumtemperatur gelöst und zwei Tropfen N-Äthyldiisopropylamin zugegeben. Nach 30 Minuten wird durch mehrmalige Kodestillation mit Wasser Essigsäure entfernt und aus Äthanol umkristallisiert.

Schmp. 214°C (Lit. (101) 218°C)

R_F-Wert 0.51

b) Puromycindihydrochlorid wird wie das 5'-Acetylderivat IVa mit Essigsäureanhydrid behandelt, wobei man identische Kristalle erhält.

NMR ($CDCl_3$)	δ = 2.00	3H,s	N-ac
	δ = 2.15	3H,s	O-ac
	δ = 2.20	3H,s	O-ac
	δ = 3.58	6H,s	$N(CH_3)_2$
	δ = 3.85	3H,s	OCH_3

7.3.7. 5',2'-Dichloracetyl-N-Cbo-puromycin (XVIIIb)

80 mg getrocknetes N-Cbo-puromycin (IIa) werden bei 0°C in 20 ml trockenem Pyridin gelöst, mit vier Äquivalenten (90 mg) Chloressigsäureanhydrid versetzt und über Nacht im Kühlschrank bei 0°C stehengelassen. Nach Zugabe von wenig Wasser wird die Reaktionslösung bei 2 Torr eingedampft, in Chloroform gelöst, mit Wasser gewaschen, mit Natriumsfulat getrocknet und wieder eingedampft. Durch Umkristallisieren aus Äthanol erhält man farblose Kristalle.

Ausbeute 95 mg (94 % der Theorie)

Schmp. 165°C

R_F-Wert 0.83

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ = 4.13 4H,s 2x Clac

δ = 4.23 1H 3'-CH

δ = 4.23 1H 4'-CH

δ = 4.23 2H 5'-CH_2

δ = 5.75 1H 2'-CH

δ = 6.07 1H 1'-CH

$C_{34}H_{37}N_7O_9Cl_2$ (758)

Ber. C 53.82 H 4.88 N 12.93 Cl 9.37

Gef. C 54.09 H 4.96 N 12.97 Cl 9.34

7.3.8. 5'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin (IIIb)

200 mg 5',2'-Dichloracetyl-N-Cbo-puromycin (XVIIIb) werden in 100 ml Methanol und möglichst wenig Chloroform gelöst. Dazu werden 2 ml 2n-Ammoniak getropft und sofort (!) im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Auf einer Kieselgelsäule (2 x 40 cm, je 1.5 l Chloroform und Chloroform/Methanol (98:2), linearer Gradient) werden nacheinander 5'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin (IIIb) und vollständig desacyliertes N-Cbo-puromycin (IIa) erhalten. Die erste große Fraktion wird eingedampft und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute 124 mg (70 % der Theorie)

Schmp. 206°C

R_F-Wert 0.78

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ = 4.23 2H,s Clac

δ = 4.33 2H,d 5'-CH_2

δ = 4.2-4.7 4H Ribose

δ = 5.93 1H,d 1'-CH

$C_{32}H_{36}N_7O_8Cl$ (681.5)

Ber. C 56.35 H 5.28 N 14.38 Cl 5.21 OCH_3 4.55

Gef. C 56.24 H 5.49 N 14.40 Cl 5.49 OCH_3 4.66

7.3.9. 2'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin (IIIe)

200 mg N-Cbo-puromycin (IIa) werden durch Kodestillation mit Pyridin getrocknet, in Pyridin gelöst, bei Raumtemperatur mit zwei Äquivalenten Chloressigsäureanhydrid (120 mg) versetzt und gerührt. Nach einer Stunde wird etwas Wasser zugegeben, die Reaktionslösung zur Trockne eingedampft, in etwas Chloroform gelöst und auf eine Kieselgelsäule (2 x 40 cm, je 1.5 l Chloroform und Chloroform/Methanol (98:2), linearer Gradient) gegeben. Nacheinander werden vier Fraktionen aufgefangen:

1.) 2',5'-Dichloracetyl-Cbo-puromycin (XVIIIb)

20 %, R_F-Wert 0.83

2.) 5'-Chloracetyl-Cbo-puromycin (IIIb)

10 %, R_F-Wert 0.78

3.) 2'-Chloracetyl-Cbo-puromycin (IIIe)

35 %, R_F-Wert 0.71

4.) N-Cbo-puromycin (IIa)

30 %, R_F-Wert 0.66

Die dritte Fraktion zeigt im NMR ($CDCl_3$) folgende wichtige Signale:

δ = 3.77	2H,d	5'-CH_2
δ = 4.07	2H	Clac
δ = 4.0-4.5	3H	4' + 3'-CH
δ = 5.37	1H	2'-CH
δ = 5.90	1H	1'-CH

7.3.1O. 5'-Chloracetylpuromycin (IVb)

5O mg 5'-Chloracetyl-N-Cbo-puromycin (IIIb) werden in 5 ml Eisessig gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (3O mg) zwei Stunden lang bei Raumtemperatur in einer Schüttelapparatur katalytisch hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird zur Entfernung der Essigsäure mehrmals mit Wasser im Rotationsverdampfer abgedampft. Durch Umkristallisieren aus Isopropanol erhält man farblose Kristalle.

Ausbeute 33 mg (85 % der Theorie)

Schmp. 146°C

R_F-Wert O.3O

λ_{max} 275 nm (CH_3OH)

NMR (CD_3OD + $CDCl_3$)	δ = 2.93	2H,d	ß-CH_2
	δ = 3.54	6H,s	$N(CH_3)_2$
	δ = 3.8O	3H,s	OCH_3
	δ = 4.1-4.6	5H	Ribose
	δ = 6.OO	1H,s	1'-CH
	δ = 7.OO	4H,q	Phe
	δ = 8.13	1H,s	2-CH
	δ = 8.25	1H,s	8-CH

$C_{24}H_{3o}N_7O_6Cl$ (547.5)

Ber. C 52.6O H 5.48 Cl 6.48

Gef. C 52.O5 H 5.76 Cl 7.34

7.3.11. 5'-Chloracetyl-N,2'-diacetyl-puromycin (XIXb)

30 mg 5'-Chloracetylpuromycin (IVb) werden in 5 ml Essigsäureanhydrid bei Raumtemperatur gelöst und zwei Tropfen N-Äthyl-diisopropylamin als Base dazugegeben und gerührt. Nach 30 Minuten wird die Reaktionslösung bei 2 Torr eingedampft. Im DC läuft außer Spuren eines Nebenproduktes (R_F-Wert 0.44) das gewünschte Produkt XIXb bei R_F-Wert 0.52, das man leicht durch Umkristallisieren aus Äthanol zu farblosen, feinen Nadeln reinigen kann.

Ausbeute 33 mg (95 % der Theorie)

Schmp. 177°C

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ = 2.00 3H,s N-ac

δ = 2.20 3H,s O-ac

δ = 4.20 2H,s O-Clac

Massenspektrum: M^+: m/e = 631/633, Intensitäten: 100/39,6; M^++1: m/e = 632/634, Intensitäten: 33,92/12,13; M^+-Cl: m/e = 596

Basis-Peak: m/e = 121 ($^+CH_2$-C_6H_4-O-CH_3)

$C_{28}H_{34}N_7O_8Cl$ (631.5)

Ber. C 53.21 H 5.38 N 15.52 Cl 5.62

Gef. C 53.30 H 5.53 N 15.27 Cl 4.81

7.3.12. Bromessigsäureanhydrid

2.78 g Bromessigsäure (20 mMol) werden in 20 ml Äthylacetat gelöst und mit 2.27 g Dicyclohexylcarbodiimid (11 mMol) unter Rühren bei Raumtemperatur versetzt, wobei sofort Dicyclohexylharnstoff ausfällt. Nach einer Stunde wird abfiltriert, die Lösung auf 5 ml eingeengt und erneut abfiltriert. Beim völligen Eindampfen der Lösung bilden sich farblose Kristalle, die an feuchter Luft

zerfließen. Das NMR-Spektrum der reinen Substanz zeigt in Chloroform einen einzigen Peak bei δ = 4.08 ppm.

7.3.13. 5'-Bromacetyl-N-Cbo-puromycin (IIIc)

257 mg (0.45 mMol) N-Cbo-puromycin (IIa) werden in 20 ml trockenem Dimethylformamid gelöst, zu einer Lösung von 130 mg Bromessigsäureanhydrid (0.5 mMol) in 20 ml Dimethylformamid gegeben und 90 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird bei 2 Torr eingedampft und das Reaktionsgemisch in Chloroform gelöst. Im DC erkennt man, daß nur ein Drittel der Ausgangssubstanz IIa umgesetzt wurde. Die Substanz IIIc wird auf drei präparativen Kieselgelplatten mit Chloroform/Methanol (95:5) aufgereinigt. Nach dem Eindampfen der Lösungsmittel erhält man weiße Kristalle.

Ausbeute 102 mg (33 % der Theorie)

Schmp. 175°C

R_F-Wert 0.78

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ = 4.05 2H,s Brac

δ = 5.15 2H,s Cbo

$C_{32}H_{36}N_7O_8Br$ (726)

Ber. C 52.90 H 4.99 N 13.49 Br 11.00

Gef. C 52.81 H 4.99 N 13.30 Br 11.0

7.3.14. N-t-Butyloxycarbonyl-puromycin (IIb)

500 mg Puromycindihydrochlorid (0.92 mMol) werden in 30 ml abs. Dimethylformamid gelöst. Bei Zugabe von 225 µl Triäthylamin (1.84 mMol) fällt ein

feiner Niederschlag aus. Zu dieser Suspension werden 143 mg (1 mMol) t-Butyloxycarbonylazid getropft und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 18 Stunden werden nochmals 225 µl Triäthylamin und 143 mg BOC-azid zugegeben und weitere 20 Stunden gerührt. Die Lösung wird bei 2 Torr und Raumtemperatur eingedampft, das Produkt in Chloroform gelöst, auf zwei präparativen Kieselgelplatten mit Chloroform/Methanol (9:1) vom Ausgangsstoff getrennt und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute 460 mg (87.5 % der Theorie)

Schmp. 204-205°C

R_F-Wert 0.66

NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD) δ = 1.44 9H,s $C(CH_3)_3$

δ = 3.58 6H,s $N(CH_3)_2$

δ = 3.85 3H,s OCH_3

$C_{27}H_{37}N_7O_7$ (571)

Ber. C 56.73 H 6.52 N 17.15

Gef. C 55.70 H 6.32 N 16.95

7.3.15. 5'-Bromacetyl-N-BOC-puromycin (IIId)

228 mg N-BOC-puromycin (IIb) (0.40 mMol) werden durch Kodestillation mit abs. Pyridin getrocknet, in 20 ml abs. Dimethylformamid gelöst und zu 150 mg Bromessigsäureanhydrid (0.60 mMol) gegeben. Nach Zugabe von zwei Tropfen N-Äthyldiisopropylamin wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach eingedampft. Auf drei präparativen Kieselgelplatten werden mit Chloroform/Äthanol (40:1) als Laufmittel zwei große Zonen getrennt: 50 % nicht umgesetztes Produkt IIb und 25 % Bromacetyl-BOC-puromycin (IIId). Das gewünschte Produkt wird isoliert, eingedampft und aus Benzol/Methanol zu farblosen Nadeln umkristallisiert.

Ausbeute 70 mg (25 % der Theorie)

Schmp. 148°C

R_F-Wert 0.78

λ_{max} 275 nm (CH_3OH)

NMR ($CDCl_3$) δ = 3.99 2H,s Brac

$C_{29}H_{38}N_7O_8Br$ (692)

Ber. C 50.29 H 5.53 N 14.16 Br 11.54

Gef. C 50.77 H 5.64 N 14.13 Br 10.88

7.3.16. 5'-Bromacetylpuromycin (IVc)

50 mg 5'-Bromacetyl-N-BOC-puromycin (IIId) werden mit 5 ml 100 %iger Trifluoressigsäure versetzt und die Lösung sofort im Vakuum eingedampft. Anschließend wird noch mehrmals mit Acetonitril abgedampft. Im DC läuft nur eine Substanz, die eine positive Ninhydrinreaktion ergibt. Das Produkt IVc wird auf einer präparativen Kieselgelplatte mit Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel gereinigt und eingedampft.

Ausbeute 33 mg (77 % der Theorie)

R_F-Wert 0.31

λ_{max} 275 nm (CH_3OH)

$C_{24}H_{30}N_7O_6Br$ (592)

Ber. C 48.65 H 5.10 N 16.55 Br 13.48

Gef. C 47.71 H 5.48 N 16.35 Br 13.10

7.3.17. 5'-Acetoxyacetyl-2',N-diacetylpuromycin (XX)

33 mg 5'-Bromacetylpuromycin (IVc) werden in 20 ml Essigsäureanhydrid und zwei Tropfen N-Äthyldiisopropylamin gelöst und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die rotbraune Lösung wird durch Kodestillation mit Wasser von Essigsäure befreit, zur Trockne eingedampft, in Chloroform gelöst und auf einer präparativen Kieselgelplatte mit Chloroform/Äthanol (99:1) gereinigt. Die am weistesten laufende Zone wird aufgearbeitet und aus Äthanol umkristallisiert. Die farblosen Kristalle enthalten noch geringe Mengen des Hydrobromids.

Schmp. 108° C

R_F-Wert 0.52

NMR ($CDCl_3$) δ = 1.97 3H,s N-ac

δ = 2.14 3H,s O-ac

δ = 2.17 3H,s O-ac

δ = 4.60 2H,s $CO_2-CH_2-CO_2$

Massenspektrum: M^+: m/e = 655

Basis-Peak: m/e = 121 ($^+CH_2-C_6H_4-O-CH_3$)

$C_{30}H_{37}N_7O_{10}$ (655)

Ber. C 54.95 H 5.68

Gef. C 53.89 H 5.52

7.4. Biologische Tests

7.4.1. Präparation von E.coli-Ribosomen

5 g tiefgefrorene (-20°C) E.coli A19-log-phase-Zellen (RNase-frei) werden im Mörser bei 0°C 5 Minuten lang mit 8 g Alumina zu einer homogenen Paste zerrieben und anschließend unter Zugabe von 50 µg DNase (RNase-frei) mit 10 ml

Puffer versetzt (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 14 mM $Mg(CH_3CO_2)_2$, 60 mM KCl, 2 mM DTT). Die Suspension wird 30 Minuten lang bei 2°C und 19 000 rpm zentrifugiert (Rotor SS 34, 30 000 g). Der Überstand (S-30) kann bis 1 cm oberhalb des Pellets abgehebert werden und in kleinen Portionen bei -20°C und pH 6.5 zur Verwendung für die poly U-abhängige poly-Phe-Synthese aufbewahrt werden.

Zur weiteren Reinigung der Ribosomen wird der S-30-Überstand in halbgefüllte 8 ml-Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen auf RNase-freie Saccharoselösung aufgetragen (1.1 M Saccharose, 0.5 M NH_4Cl, 10 mM $Mg(CH_3CO_2)_2$, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA). 18 Stunden lang wird bei 2°C und 40 000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Spinco L2 65B, Rotor: 50Ti, 105 000 g). Der Überstand (S-100) wird verworfen, das klare, farblose Pellet gründlich mit Wasser gewaschen und im Puffer gelöst (0.5 M NH_4Cl, 10 mM $Mg(CH_3CO_2)_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA). Die aggregierten Ribosomen, die sich nicht im Puffer lösen, werden abzentrifugiert (SS 34, 2°C, 10 min, 16 000 rpm). Der Überstand wird wieder auf eine Saccharosepufferlösung gegeben und 18 Stunden zentrifugiert. Das feste Pellet wird wieder mit Wasser gewaschen und anschließend in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NH_4Cl, 50 mM KCl, 10 mM $Mg(CH_3CO_2)_2$) gelöst und bei -60°C aufbewahrt.

7.4.2. Poly U-abhängige poly-Phe-Synthese

Alle Lösungen werden in quarzdestilliertem Wasser hergestellt und auf pH 7.0 - 7.8 eingestellt. Die Komponenten der Reaktionsmischung werden immer in der angegebenen Reihenfolge unter Eiskühlung mit Mikropipetten zusammengegeben. Bevor die Reaktionsmischung zusammenpipettiert wird, werden durchnumerierte 5 ml-Aliquotgläser mit je 0.5 ml BSA-Lösung (100 µg/ml) und 0.5 ml

10 %ige TCA-Lösung versetzt und in Eis gestellt. Der 100 µl-Reaktionsansatz besteht aus 40 µl Wasser, 10 µl Mix 1, 30 µl Mix 3, 10 µl poly U (120 A_{260}-Einheiten/ml) und 10 µl S-30-Extrakt. (2 ml Mix 3 enthalten 500 µl 10 mM ATP, 250 µl 20 mM GTP, 250 µl 100 mM PEP, 10 µl Pyruvatkinase (10 mg/ml), 150 µl ^{3}H-Phenylalanin (1 mCi/ml, 10 mCi/µMol), 1 µl E.coli-tRNS (100 mg/ml) und 340 µl Wasser).

Wenn die S-30 Fraktion einpipettiert worden ist, wird die Mischung in ein 37°C-Bad gestellt und die Stoppuhr angestellt. Nach 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten werden je 10 µl entnommen, in die Aliquotgläser gegeben, ohne daß die Pipette mit TCA in Berührung kommt, und kurz geschüttelt. Nach der TCA-Fällung werden die Aliquotgläschen 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt und anschließend die Niederschläge auf Nitrozellulosefiltern (Sartorius Membranfilter, Porengröße 0.45 µ) abgefiltert. Die Filter werden dreimal mit 5 ml 5 %iger TCA gewaschen, unter einer IR-Lampe getrocknet und mit Toluol-Szintillationsmischung im Szintillationszähler gezählt. Die Membranfilter wurden kurz vor Gebrauch in 5 %iger TCA eingeweicht.

Um die Inhibitorwirkung von Puromycin und seinen Analogen zu testen, wurden zur Reaktionsmischung entweder 2, 10 oder 40 µl der jeweiligen Lösung statt der entsprechenden Wassermenge zugegeben. Auswertung in Kap. 5.1.

7.4.3. Beladung von $tRNS^{Phe}$ mit ^{14}C-Phenylalanin

Unter Eiskühlung wird folgender Reaktionsmix (4 ml) zusammengegeben und bei 37°C inkubiert: 100 µl $tRNS^{Phe}$ (21 A_{260}-Einheiten), 400 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.65, 400 µl 1 M KCl, 200 µl 1 M $MgSO_4$, 80 µl 0.1 M ATP, 800 µl 0.1 mM ^{14}C-Phe

(500 Ci/Mol), 4 µl Mercaptoäthanol, 2000 µl Wasser, 40 µl BSA (10 mg/ml), 20 µl Phe-tRNS-Synthetase (0.2 Einheiten; spez.Aktivität: 1,82 U/mg). Der Verlauf der Reaktion wird verfolgt, indem man 10 µl-Proben der Lösung auf Filterpapier gibt, zweimal mit 5 %iger TCA, einmal mit Äthanol und einmal mit Äther wäscht, anschließend trocknet und im Szintillationszähler die Reaktivität mißt. Nach 20 Minuten werden 700 µl 2 M Natriumacetat (pH 4.5) zugegeben und durch Schütteln mit 4ml Sevag (Chloroform-Isoamylalkohol 5:3) die Proteine denaturiert. Nach Zentrifugieren bei 2000 rpm wird die wässrige Phase abpipettiert und auf eine Sephadex-Säule G25 gegeben, die vorher mit 1 mM $NaCH_3CO_2$ (pH 4.5) äquilibriert wurde. Die erste UV-aktive Fraktion wird aufgefangen und im Vakuum bei Raumtemperatur auf 0.5 ml eingeengt. Aus dieser Lösung fällt man mit der dreifachen Menge Äthanol Phe-tRNS, läßt eine Stunde bei $0^{\circ}C$ stehen und zentrifugiert 30 Minuten lang bei $0^{\circ}C$ und 6000 rpm. Der Überstand, der beim Test nur wenig radioaktiv sein darf, wird verworfen. Das Pellet wird in 80 %igem Alkohol suspendiert und nach einer Stunde wieder zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wird in gleicher Weise noch einmal mit 100 %igem Alkohol gewaschen. Das Produkt (65 % Ausbeute) wird im Exsikkator bei 13 Torr und Raumtemperatur getrocknet.

7.4.4. N-Acetoxysuccinimid

620 mg Dicyclohexylcarbodiimid (3 mMol) in 4 ml Äthylacetat und 345 mg N-Hydroxysuccinimid (3 mMol) in 10 ml Äthylacetat werden zu 170 µl Essigsäure (3 mMol) in 10 ml Äthylacetat gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur im geschlossenen Kolben gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, die Lösung bis auf 3 ml eingeengt, wieder filtriert und in 150 ml

Petroläther gegossen. Nach zwei Stunden bei 0°C hat sich ein feinkristalliner Niederschlag gebildet, der wieder in Äthylacetat gelöst und mit Petroläther ausgefällt wird. Das Produkt wird im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Das NMR-Spektrum der gereinigten Substanz in Chloroform zeigt zwei Peaks:

$\delta = 2.38$	3H,s	CH_3-CO_2-
$\delta = 2.88$	4H,s	$-CH_2-CH_2-$

Schmp. 130°C (Lit. (102) 130°C)

7.4.5. Acetylierung von Phe-tRNS

40 mg Acetoxysuccinimid werden in 800 µl frisch destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst. 13 A_{260}-Einheiten getrocknete Phe-tRNS werden möglichst schnell bei 0°C in 200 µl Triäthylamin-Puffer (0.2 M TEA, pH 8.0) gelöst und sofort mit der DMSO-Lösung versetzt. Nach zwei Stunden bei 0°C wird 50 µl Dichloressigsäure (pH 3.0) zugegeben und mit 3 ml kaltem 100 %igen Äthanol N-Acetyl-Phe-tRNS ausgefällt und noch eine Stunde stehengelassen. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 0°C und 5000 rpm wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 80 %igem Alkohol suspendiert, zentrifugiert und nochmals mit 100 %igem Alkohol gewaschen. Das gereinigte Pellet wird in Alkohol (100 %) suspendiert und in kleinen Mengen bei -20°C aufbewahrt. Ausbeute: 83 % der Theorie.

Vor dem weiteren Gebrauch wird wieder zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet im gewünschten Puffer gelöst.

7.4.6. Hydrolyse von ac-Phe-tRNS

Das Reaktionsgemisch aus 5O µl ac-Phe-tRNS in 98 %igem Äthanol, 2O µl 1 M Tris-HCl, pH 9.O und 13O µl Wasser wird bei 37°C inkubiert. Nach O, 8, 2O, 42, 6O und 9O Minuten werden 2O µl-Proben entnommen und auf Whatman-Filterpapiere pipettiert. Die Filter werden zweimal mit kalter 5 %iger TCA behandelt, je einmal mit Äthanol und Äther gewaschen und unter einer IR-Lampe getrocknet. Nach Zugabe von je 1O ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit wird der Gehalt an radioaktiver ac-Phe-tRNS im Szintillationszähler gemessen. Auswertung in Kap. 5.2.2.

7.4.7. Peptidyltransferase-Versuche mit Äthylacetat-Extraktion

1OO µl-Reaktionsansätze, bestehend aus 1O µl Mix 1, 1O µl poly U (38 µg), 15 µl Ac-^{14}C-Phe-tRNS (45 OOO cpm, O.O66 A_{26o}-Einheiten, 115 pMol), Puromycin, 5'-Chloracetyl- oder 5'-Bromacetyl-puromycin (35 nMol) in 1O µl Methanol, 1O µl Ribosomen (2.4 A_{26o}-Einheiten, 6 nMol) und 45 µl bidestilliertes Wasser werden bei 37°C inkubiert. Nach 4O Minuten werden 8O µl aus der Lösung entnommen und mit 1OO µl O.2 M KH_2PO_4-Pufferlösung (pH 4.5) versetzt. Nach Zugabe von 1.5 ml Äthylacetat werden die beiden Phasen durch intensives Schütteln vermischt und anschließend durch kurze Zentrifugation getrennt. O.5 ml des Äthylacetat-Extraktes werden mit 5 ml Bray-Lösung im Szintillationszähler ausgezählt.

7.4.8. Peptidyltransferase-Versuche mit TCA-Fällung

100 µl-Reaktionsansätze, bestehend aus 10 µl Mix 1, 5 µl poly U (19 µg), 15 µl Ac-^{14}C-Phe-tRNS (17 000 cpm, 0.015 A_{260}-Einheiten, 26 pMol), 10 µl Ribosomen (2.4 A_{260}-Einheiten, 6 nMol), 10 µl Puromycin oder 5'-Bromacetylpuromycin (45 nMol) und Wasser werden nach Zugabe der Ribosomen bei 37°C inkubiert. Nach 0, 10 und 30 Minuten werden jeweils 15 µl-Proben entnommen und mit je 0.5 ml BSA-Lösung (0.2 mg/ml) und 10 %iger TCA-Lösung bei 0°C versetzt. Der gebildete Niederschlag wird auf Nitrozellulose-Membranfilter (Sartorius, Porengröße 45 µ) abgefiltert. Die Filter werden dreimal mit 5 ml 5 %iger TCA gewaschen, unter einer IR-Lampe getrocknet und in 10 ml Toluol-Szintillationslösung im Szintillationszähler gezählt.

a) mit Präinkubation:
Soll der Reaktionsansatz präinkubiert werden, wird die Lösung eine Stunde lang ohne Ac-^{14}C-Phe-tRNS bei 37°C gehalten und erst dann mit der tRNS wie oben behandelt.

b) mit RNase-Behandlung:
Der Versuch wird wie oben durchgeführt. Vor der Fällung mit TCA werden die 15 µl-Proben jedoch noch 15 Minuten lang mit 15 µl RNase A aus Pankreas (5 mg/ml) bei 37°C inkubiert.

7.4.9. Peptidyltransferase-Versuche ohne DTT

90 µl-Reaktionsansätze, bestehend aus 10 µl Mix 2, 5 µl poly U (19 µg), 10 µl Puromycin oder 5'-Bromacetylpuromycin (45 nMol) und 20 µl Ribosomen (4.8 A_{260}-Einheiten, 12 nMol) werden bei 37°C präinkubiert und nach Zugabe von

15 µl Ac-^{14}C-Phe-tRNS (17 000 cpm, 26 pMol) inkubiert. Zu bestimmten Zeiten werden jeweils 15 µl-Proben entnommen und mit 15 µl RNase A aus Pankreas (5 mg/ml) wieder 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei 0°C wird mit 0.5 ml BSA-Lösung (0.2 mg/ml) und 10 %iger TCA versetzt. Der Niederschlag wird mit Milliporefiltern (HAWP 02500, HA 0.45 µ, weiß, glatt) abfiltriert und zweimal mit 5 %iger TCA gewaschen. Nach dem Trocknen unter der IR-Lampe und Zugabe von 10 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit wird im Szintillationszähler ausgezählt. Auswertung in Kap. 5.2.3.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. R.A. Garrett und H.G. Wittmann, Endeavour 32, 8 (1973).
2. H. Matthaei, G. Sander, D. Swan, T. Kreuzer, H. Caffier und A. Parmeggiani, Naturwissenschaften 55, 281 (1968).
3. F. Gros und M. Revel, Peptides 1968, North-Holland Publ.Comp., Amsterdam, 118 (1968).
4. F. Lipmann, Science 164, 1024 (1969).
5. P. Lengyel und D. Söll, Bacteriol.Rev. 33, 264 (1969).
6. A.S. Spirin, Cold Spring Harbor Symp. 34, 197 (1969).
7. K. Nierhaus und J. Weber, Umschau 72, 346 (1972).
8. P. Leder, Adv.Prot.Chem. 27, 213 (1973).
9. R. Haselkorn und L.B. Rothman-Denes, Ann.Rev.Biochem. 42, 397 (1973).
10. S. Osawa, Ann.Rev.Biochem. 37, 109 (1968).
11. G.P. Craven, P. Voynow, S.H.S. Hardy und C.G. Kurland, Biochemistry 8, 2897 (1969).
12. S.J.S. Hardy, C.G. Kurland, P. Voynow und G. Mora, Biochemistry 8, 2906 (1969).
13. P. Traub, Current Topics Microbiol. 52, 1 (1970).
14. M. Nomura, Bacteriol.Rev. 34, 228 (1970).
15. R.A. Garrett und H.G. Wittmann, Adv.Prot.Chem. 27, 278 (1973).
16. M.B. Yarmolinsky und G.L. de la Haba, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 45, 1721 (1959).
17. R.J. Suhadolnik, Nucleoside Antibiotics, Wiley-Interscience, 1970, 3.
18. D. Nathans, Antibiotics, Springer-Verlag 1, 259 (1967).
19. B.R. Baker, J.P. Joseph und J.H. Williams, J.Amer.Chem.Soc. 77, 1 (1955).
20. A. Morris und R. Schweet, Biochim.Biophys.Acta 47, 415 (1961).

21. W. Gilbert, J.Mol.Biol. 6, 374 und 389 (1963).

22. D.W. Allen und P.C. Zameknik, Biochim.Biophys.Acta 55, 865 (1962).

23. J.D. Smith, R.R. Traut, G.M. Blackborn und R.E. Monro, J.Mol.Biol. 13, 617 (1965).

24. R.R. Traut und R.E. Monro, J.Mol.Biol. 10, 63 (1964).

25. M.W. Nirenberg, J.H. Matthaei und O.W. Jones, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 48, 104 (1962).

26. H. Weissbach, B. Redfield und N. Brot, Arch.Biochem.Biophys. 127, 705 (1968).

27. C. Coutsogeorgopoulos, R. Fico und J.T. Miller, Biochem.Biophys.Res. Commun. 47, 1056 (1972).

28. R.E. Monro, T. Staehelin, M.L. Celma und D. Vazquez, Cold Spring Harbor Symp. 34, 357 (1969).

29. R.E. Monro, Methods in Enzymology 20, 472 (1971).

30. R.E. Monro, J.Mol.Biol. 26, 147 (1967).

31. R.E. Monro und K.A. Marcker, J.Mol.Biol. 25, 347 (1967).

32. R.E. Monro, J. Cerna und K.A. Marcker, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 61, 1042 (1968).

33. M.S. Bretscher und K.A. Marcker, Nature 211, 380 (1966).

34. C. Coutsogeorgopoulos, Biochemistry 6, 1704 (1967).

35. S. Tanaka, K. Igarashi und A. Kaji, J.Biol.Chem. 247, 45 (1972).

36. M.E. Gottesman, J.Biol.Chem. 242, 5564 (1967).

37. S.J. Singer, Adv.Prot.Chem. 22, 1 (1967).

38. M. Pellegrini, H. Oen und C.R. Cantor, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 837 (1972).

39. H. Oen, M. Pellegrini, D. Eilat und C.R. Cantor, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 2799 (1973).

40. A.P. Czernilofsky und E. Kuechler, Biochim.Biophys.Acta 272, 667 (1972).

41. A.P. Czernilofsky, E.E. Collatz, G. Stöffler und E. Kuechler, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 71, 230 (1974).

42. L. Bispink und H. Matthaei, FEBS-Letters 37, 291 (1973).

43. R. Bald, V.A. Erdmann und O. Pongs, FEBS-Letters 28, 149 (1972).

44. O. Pongs, R. Bald und V.A. Erdmann, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 2229 (1973).

45. N. Sonenberg, M. Wilchek und A. Zamir, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 1423 (1973).

46. N. Sonenberg, A. Zamir und M. Wilchek, Biochem.Biophys.Res.Commun. 59, 693 (1974).

47. O. Pongs, R. Bald, T. Wagner und V.A. Erdmann, FEBS-Letters 35, 137 (1973).

48. O. Pongs, K.H. Nierhaus, V.A. Erdmann und H.G. Wittmann, FEBS-Letters 40, Supplement, S28 (1974).

49. R.J. Harris, P. Greenwell und R.H. Symons, Biochem.Biophys.Res.Commun. 55, 117 (1973).

50. D. Nathans und A. Neidle, Nature 197, 1076 (1963).

51. D. Nathans, Fed.Proc. 23, 984 (1964).

52. J.P. Waller, T. Erdös, F. Lemoine, S. Guttmann und E. Sandrin, Biochim. Biophys.Acta 119, 566 (1966).

53. J. Cerna, S. Chladek, I. Rychlik und J. Zemlicka, Biochim.Biophys.Acta 199, 291 (1970).

54. J. Cerna, I. Rychlik, J. Zemlicka und S. Chladek, Biochim.Biophys.Acta 204, 203 (1970).

55. I. Rychlik, S. Chladek und J. Zemlicka, Biochim.Biophys.Acta 138, 640 (1967).

56. J.F.B. Mercer und R.H. Symons, Eur.J.Biochem. 28, 38 (1972).

57. R.J. Harris, J.F.B. Mercer, D.C. Skingle und R.H. Symons, Can.J.Biochem. 50, 918 (1972).

58. R.H. Symons, R.J. Harris, L.P. Clarke, J.F. Wheldrake und W.H. Elliott, Biochim.Biophys.Acta 179, 248 (1969).

59. R.J. Harris, J.E. Hanlon und R.H. Symons, Biochim.Biophys.Acta 240, 244 (1971).

60. D.J. Eckermann, P. Greenwell und R.H. Symons, Eur.J.Biochem. 41, 547 (1974).

61. D.H. Rammler und H.G. Khorana, J.Amer.Chem.Soc. 85, 1997 (1963).

62. S. Chladek, P. Pulkrabek, J. Sonnenbichler, J. Zemlicka und I. Rychlik, Coll.Czech.Chem.Comm. 35, 2296 (1970).

63. I. Rychlik, J. Cerna, S. Chladek, J. Zemlicka und Z. Haladova, J.Mol.Biol. 43, 13 (1969).

64. V.A. Pozdnyakov, Yu.V. Mitin, M.K. Kukhanova, L.V. Nikolayeva, A.A. Krayeosky und B.P. Gottikh, FEBS-Letters 24, 177 (1972).

65. A.F. Cook und D.T. Maichuk, J.Org.Chem. 35, 1940 (1970).

66. M. Bertolini und C.P.J. Glaudemans, Carbohydr.Res. 15, 263 (1970).

67. H.A. Arfmann, Dissertation, Braunschweig 1971.

68. K.P. Polzhofer, Tetrahedron Letters 1969, 2305.

69. E. Katchalski, Methods in Enzymology 3, 540 (1957).

70. R.A. Boissonnas, Adv.Org.Chem. 3, 160 (1963).

71. H.G. Zachau und H. Feldmann, Progr.Nucleic Acid Res. 4, 217 (1965).

72. J. Zemlicka, S. Chladek, Z. Haladova und I. Rychlik, Coll.Czech.Chem. Comm. 34, 3755 (1969).

73. M.J. Robins, R.A. Jones und M. MacCoss, Biochemistry 13, 553 (1974).

74. H.G. Zachau und W. Karau, Chem.Ber. 93, 1830 (1960).

75. T. Wieland, H. Merz und G. Pfleiderer, Chem.Ber. 93, 1816 (1960).

76. W.C. Francis, J.R. Thornton, J.C. Werner und T.R. Hopkins, J.Amer.Chem. Soc. 80, 6238 (1958).

77. R.J. Wineman, E.T. Hsu und C.E. Anagnostopoulos, J.Amer.Chem.Soc. 80, 6233 (1958).

78. S.H. Eggers, S.I. Biedron und A.O. Hawtrey, Tetrahedron Letters 1966, 3271.

79. H. Venner, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 339, 14 (1964).

8o. H. Venner, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 344, 189 (1966).

81. J.H. Matthaei und M.W. Nirenberg, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 47, 1580 (1961).

82. M.W. Nirenberg und J.H. Matthaei, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 47, 1588 (1961).

83. M.W. Nirenberg, Methods in Enzymology 6, 17 (1963).

84. O. Pongs und V.A. Erdmann, FEBS-Letters 37, 47 (1973).

85. T. Staehelin, D. Maglott und R.E. Monro, Cold Spring Harbor Symp. 34, 39 (1969).

86. A.L. Haenni und F. Chapeville, Biochim.Biophys.Acta 114, 135 (1966).

87. S. Pestka, Arch.Biochem.Biophys. 136, 80 (1970).

88. S. Pestka, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 624 (1972).

89. J. Modolell, B. Cabrer und D. Vazquez, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 3561 (1973).

9o. N. de Groot, A. Panet und Y. Lapidot, Eur.J.Biochem. 15, 215 (1970).

91. A. Panet, N. de Groot und Y. Lapidot, Eur.J.Biochem. 15, 222 (1970).

92. P. Leder und H. Bursztyn, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 56, 1579 (1966).

93. P. Leder und H. Bursztyn, Biochem.Biophys.Res.Commun. 25, 233 (1966).

94. Y. Lapidot, N. de Groot, S. Rappoport und A.D. Hamburger, Biochim.Biophys. Acta 149, 532 (1967).

95. N. de Groot, Y. Lapidot, A. Panet und Y. Wohnan, Biochem.Biophys.Res. Commun. 25, 17 (1966).

96. M. Sprinzl und F. Cramer, Nature New Biol. 245, 3 (1973).

97. J.P.G. Ballesta und D. Vazquez, Biochemistry 12, 5063 (1973).

98. A.S. Spirin und E.B. Lishnevskaya, FEBS-Letters 14, 114 (1971).

99. D. Ringer und S. Chladek, FEBS-Letters 39, 75 (1974).

1oo. W. Anderson, D.H. Hayes, A.M. Michelson und A.R. Todd, J.Chem.Soc. 1954, 1882.

101. P.W. Fryth, C.W. Waller, B.L. Hutchings und J.H. Williams, J.Amer.Chem. Soc. 80, 2737 (1958).

102. A. Hantzsch und J. Urbahn, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 28, 754 (1895).

LEBENSLAUF

Am 15. März 1945 wurde ich, Hans-Hagen von Döhren, als Sohn des Landwirts Hans-Helmut von Döhren und seiner Ehefrau Maria-Elisabeth, geb. Hoppenstedt, in Lüneburg geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit in Bochum-Langendreer besuchte ich dort das neusprachliche Lessing-Gymnasium, wo ich am 27. Februar 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Von April 1964 bis März 1966 leistete ich Dienst bei der Bundeswehr.

An der Universität Göttingen begann ich im April 1966 das Studium der Chemie, legte hier am 6. Juli 1970 das Diplomvorexamen ab und bestand am 28. April 1972 nach Durchführung meiner Diplomarbeit bei Herrn Professor Dr. H. Brockmann am organisch-chemischen Institut der Universität Göttingen das Diplomhauptexamen.

An der vorliegenden Dissertation arbeitete ich seit Juli 1972 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. F. Eckstein.

Am 7. Juli 1972 heiratete ich Brigitte Klempt-Gießing.